

Universidad Publica de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

**EFFECTOS DE CHIPS DE ROBLE SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
Y COMPOSICIÓN FENÓLICA DE UN VINO TEMPRANILLO**

.....

presentado por

MAITE ARLEGUI OCHOA

.....(e)k

aurkeztua

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD EN
LAS INDUSTRIAS AGROALIMENTARIAS**

Septiembre, 2014 / 2014, Iraila

Montserrat Navarro Huidobro e Iñigo Arozarena Martincorena, profesores del Departamento de Tecnología de Alimentos, autorizan la presentación por parte de Maite Arlegui Ochoa del Trabajo Fin de Máster titulado “Efectos de chips de roble sobre la actividad antioxidante y composición fenólica de un vino tempranillo”.

En Pamplona, a 11 de septiembre de 2014.

Fdo. Montserrat Navarro Huidobro

Fdo. Iñigo Arozarena Martincorena

RESUMEN

En los últimos años se ha visto que los compuestos fenólicos pueden tener un interés nutricional y farmacológico debido a sus propiedades antioxidantes, que están relacionadas con la capacidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre.

Al añadir chips de madera al vino se contribuye a cambiar organolépticamente el vino, se extraen taninos y compuestos aromáticos de la madera. Según el tostado de estos chips varía la cesión de los compuestos fenólicos al vino, esta cesión es mayor cuanto menor es el tostado. En cuanto a las sustancias extraíbles que pasan de la madera al vino, los compuestos más importantes son los elagitaninos. Además, los chips contribuyen aportando aromas al vino, pero también existen estudios que afirman que hay una mayor estabilización del color en vinos criados con chips con respecto a los conservados en tanques de acero inoxidable en ausencia de chips.

Por ello, el objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar la influencia de la incorporación durante tres meses de chips de diferente nivel de tostado sobre la actividad antioxidante, composición fenólica y color de un vino tempranillo. Para ello se ha estudiado la cinética de cesión de los polifenoles al vino en un vino sintético con chips y se ha comparado con los resultados obtenidos en el vino tempranillo.

El ensayo consistió en añadir chips de roble de diferente nivel de tostado a un vino tempranillo joven y a un vino sintético en la misma dosis. Cada muestra se introdujo en un envase hermético, y se almacenó a temperatura constante durante 3 meses.

La metodología que se siguió consistió en determinar la actividad antioxidante de los vinos por dos métodos, DPPH (Bobo et al.; 2014) y FRAP (Benzie et al, 1996), su concentración polifenólica total mediante el método Folin-Ciocalteu (Bobo et al.; 2014) y su composición polifenólica mediante HPLC. En el caso de los antocianos se siguió la metodología utilizada por Gonzalez del Pozo (2010) y en el caso de los elagitaninos la utilizada por Chira y Teissedre (2013). Además para la medida de color se siguió el método estándar y las coordenadas CIELAB.

Tras la realización de los análisis y tratamiento de los datos se observó que en el vino sintético los chips contribuyen claramente a la actividad antioxidante y al contenido de polifenoles, y este efecto es mayor en los chips de tostado suave. En cambio, el efecto de esta aportación de elagitaninos en los vinos tempranillo no parece tan importante en términos relativos; ya que éstos contienen de partida una gran cantidad de compuestos fenólicos, principalmente flavanoles y antocianos, que hacen que este efecto sea menos evidente. Por último, parece que la presencia de chips no tiene una influencia significativa en términos relativos en los antocianos y el color.

ÍNDICE

1.- ANTECEDENTES.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. LOS COMPUESTOS POLIFENOLICOS.....	2
1.2.1. Compuestos no flavonoides.....	3
1.2.1.1 Ácidos fenólicos.....	3
1.2.1.2. Estilbenos.....	5
1.2.2. Compuestos flavonoides.....	5
1.2.2.1. Flavonoles.....	5
1.2.2.2. Flavononoles y flavonas.....	6
1.2.2.3. Antocianos.....	6
1.2.2.4. Flavanoles.....	9
1.3. LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LOS VINOS.....	11
1.3.1. Fenómenos de difusión y extracción.....	12
1.3.2. Modificaciones de los compuestos fenólicos durante la vinificación.....	13
1.3.2.1. Reacciones bioquímicas.....	13
1.3.2.2. Reacciones químicas.....	13
1.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	15
1.4.1. Método DPPH.....	17
1.4.2. Método FRAP.....	17
1.4.3. Método Folin-Ciocalteu.....	18
1.5. EL COLOR DEL VINO.....	18
1.5.1. Análisis del color.....	19
1.5.1.1. Parámetros estándar.....	20
1.5.1.2. Coordenadas cromáticas. Espacio Cielab.....	21
1.6. LA MADERA Y EL VINO.....	23
1.6.1. Madera de roble.....	23
1.6.2. Alternativas a la madera.....	25
2.- OBJETIVOS.....	28
3.- DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
4.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
4.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ESTUDIO.....	30
4.2. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	31
4.2.1. Método DPPH.....	31
4.2.2. Método FRAP.....	32
4.2.3. Método Folin – Ciocalteu.....	34

4.3. IDENTIFICACIÓN DE COMUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE HPLC.....	35
4.3.1. Antocianos.....	35
4.3.2. Elagitaninos.....	36
4.4. ANÁLISIS DEL COLOR.....	38
4.4.1. Método estándar (CEE/Reglamento 2679/90. Método de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. Diario oficial de las comunidades Europeas).....	38
4.4.2. Método CIELAB.....	38
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
5.- RESULTADOS.....	39
5.1. VINO SINTÉTICO.....	39
5.2. VINO TEMPRANILLO.....	45
5.3. ANTOCIANOS Y COLOR.....	52
6.- CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFÍA.....	60

Índice de tablas

Tabla 1: Composición media de un vino blanco y de un vino tinto (Flanzy, 2003)	12
Tabla 2: Diseño experimental	29
Tabla 3: Características vino del ensayo.....	30
Tabla 4: Resultados del ANOVA (tiempo, chips) de los elagitaninos en los vinos sintéticos.....	40
Tabla 5. Resultados del ANOVA (tiempo, chips) en las variables polifenoles totales y de capacidad antioxidante en los vinos sintéticos.....	43
Tabla 6: Resultados del ANOVA (tiempo, chips) de los elagitaninos en los vinos tempranillo....	46
Tabla 7. Resultados del ANOVA (tiempo, chips) en las variables polifenoles totales y de capacidad antioxidante en los vinos de tempranillo.....	49
Tabla 8: Resultados del ANOVA (tiempo, chips) en las variables de color en los vinos tempranillo.....	53
Tabla 9.1: Resultados del ANOVA (tiempo, chips) de los antocianos en los vinos tempranillo...	54
Tabla 9.2.: Resultados del ANOVA (tiempo, chips) de los antocianos en los vinos tempranillo..	55
Tabla 9.3.: Resultados del ANOVA (tiempo, chips) de los antocianos en los vinos tempranillo..	55

Índice de figuras

Figura 1: Anillo fenólico.....	3
Figura 2: Principales ácidos cinámicos.....	4
Figura 3: Principales ácidos benzoicos.....	4
Figura 4: Resveratrol.....	5
Figura 5: Principales flavonoles del vino.....	6
Figura 6: Principales antocianidinas.....	7
Figura 7: Estructura de las antocianinas 3-monoglucosiladas.....	8
Figura 8: Formación del p-cumarato-3-monoglucósido de malvidina.....	8
Figura 9: Ácido gálico.....	10
Figura 10: Ácido elágico.....	10
Figura 11: Principales monómeros de flavanol.....	10
Figura 12: Espectro de absorción de un vino durante el envejecimiento.....	20
Figura 13: Coordenadas cromáticas, espacio CIELAB.....	22
Figura 14: Evolución de algunas sustancias extraíbles del roble francés según la edad del árbol (Adaptado de CIVB 1999).....	24
Figura 15: Muestras de vino sintético D+0.....	30
Figura 16: Muestras de vino joven tempranillo D+0.....	31
Figura 17: Recta patrón para el método DPPH.....	32
Figura 18: Recta patrón para el método FRAP.....	33
Figura 19: Recta patrón para el método Folin - Ciocalteu.....	35
Figura 20: Recta patrón para antocianos.....	36
Figura 21: Recta patrón para elagitaninos.....	37
Figura 22. Cromatograma de elagitaninos obtenido para el vino sintético con chips de TS (t: 90 días).	40
Figura 23: Resultados obtenidos para la estimación de elagitaninos mediante HPLC en vinos sintéticos.....	41
Figura 24: Resultados obtenidos para el ácido elágico libre mediante HPLC en vinos sintéticos.	42
Figura 25. Resultados obtenidos para polifenoles totales mediante el método FOLIN en los vinos sintéticos.....	44
Figura 26. Resultados obtenidos para la capacidad antioxidante mediante el método FRAP en los vinos sintéticos.....	44
Figura 27. Resultados obtenidos para la capacidad antioxidante mediante el método DPPH en los vinos sintéticos.....	45

Figura 28: Resultados obtenidos para la estimación de elagitaninos mediante HPLC para vinos tempranillo.....	47
Figura 29. Cromatograma de elagitaninos obtenido para el vino tempranillo con chips de TS (t: 90 días).	48
Figura 30. Resultados obtenidos para polifenoles totales mediante el método FOLIN en los vinos tempranillo.....	50
Figura 31. Resultados obtenidos para la capacidad antioxidante mediante el método FRAP en los vinos tempranillo.....	51
Figura 32. Resultados obtenidos para la capacidad antioxidante mediante el método DPPH en los vinos tempranillo.....	52
Figura 33. Cromatograma obtenido para una muestra de vino tempranillo.....	56
Figura 34. Resultados obtenidos para el contenido de antocianos totales mediante HPLC en los vinos tempranillo.....	57
Figura 35. Resultados obtenidos para el contenido de antocianos monoglucósidos mediante HPLC en los vinos tempranillo.....	57
Figura 36. Resultados obtenidos para el contenido de antocianos acilados mediante HPLC en los vinos tempranillo.....	58

1.- ANTECEDENTES

1.1. INTRODUCCIÓN

El vino es una bebida obtenida de la uva (*Vitis vinifera*) mediante la fermentación alcohólica de su mosto. La fermentación se produce por la acción metabólica de levaduras que transforman los azúcares del fruto en alcohol etílico y gas en forma de dióxido de carbono. El azúcar y los ácidos que posee la uva de *Vitis vinifera* hace que sean suficientes para el desarrollo de la fermentación, aunque el conjunto de factores ambientales (clima, latitud, altitud, horas de luz, temperatura, etc.) también contribuyen a su desarrollo.

El vino forma parte de la cultura humana desde hace unos 6000 años y en la cultura mediterránea se consume con las comidas y en las celebraciones. En los últimos años ha habido varios estudios científicos que muestran que beber moderadamente vino es beneficioso para la salud, en especial para la prevención de las enfermedades coronarias (Corder, 2008). Resultaba paradójico que los franceses mostrasen altos niveles de colesterol, en gran medida debido al consumo de mantequillas, natas y queso; y, sin embargo, presentaran una mortalidad baja por problemas de corazón. A este hecho se le llamó la “paradoja francesa”. El hecho es que los franceses, a diferencia de los habitantes de países nórdicos tomaban en las comidas una copa de vino tinto. Este efecto beneficioso sería debido a que en la elaboración del vino se incorporan la semilla y la piel de la uva, ambas con altas concentraciones de flavonoides, principalmente catequina, ácido gálico y epicatequina. Experiencias in vitro demostraron que dichos flavonoides poseen una capacidad antioxidante varias veces superior a la de las vitamina E y C; in vivo, la situación varía debido a que la absorción intestinal modifica la constitución y la velocidad de acción de estos compuestos (Rebolo, S.; 2007).

Los estudios han demostrado que consumir una o dos copas de vino reduce el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, por encima de 30 gramos diarios el alcohol causa graves daños en el hígado, el cerebro y el corazón (Val, M.; 2007).

Según algunos estudios el efecto protector del vino es superior al de otras bebidas alcohólicas (Rimm, EB, et al.; 1996), esto es debido a que reúne los efectos del propio etanol y las de los compuestos no alcohólicos (polifenólicos) que contiene. Entre los diferentes beneficios que el vino puede aportar a la salud humana (Val, M.; 2007) se pueden mencionar los siguientes: acción antiespasmódica, activación de la secreción biliar, acción antibacteriana, efecto antihistamínico, protección de las paredes arteriales, al fortalecer el colágeno y la elastina que las forman. Además el vino aporta diferentes minerales y oligoelementos, como el magnesio que disminuye el estrés, el zinc (mejora las defensas inmunitarias), el litio que equilibra el sistema nervioso, o el calcio y el magnesio.

Se han propuesto, básicamente, tres mecanismos para explicar la menor enfermedad de los consumidores regulares y moderados de vino. Dos de ellos se deben principalmente al alcohol: uno mediado por la acción del alcohol sobre los niveles de lipoproteínas presentes en la sangre, y el otro mediado por su influencia sobre la coagulación sanguínea. El tercer mecanismo estaría mediado por la capacidad de los componentes antioxidantes del vino que protegen de la oxidación a las partículas de lipoproteínas de baja densidad, de acuerdo con la hipótesis oxidativa de aterogénesis. Este mecanismo se explica por los componentes polifenólicos del vino tinto (Leighton, 1999).

1.2. LOS COMPUESTOS POLIFENOLICOS

Son compuestos que están muy extendidos en la naturaleza y juegan un papel muy importante en las características organolépticas de los alimentos, en especial de las frutas, té, vino tinto, cereales, chocolate y legumbres. Sufren modificaciones con mucha facilidad, como las oxidaciones que contribuyen al envejecimiento y madurez del vino, desarrollándose así su buen sabor a la vez que evitan la oxidación de otros componentes del mismo, que darían compuestos no deseables.

Son los responsables del color de los vinos tintos, de la astringencia, dan cuerpo y estructura al vino y ocasionalmente producen gustos amargos. Además la forma en que estas sustancias son transformadas durante el proceso de vinificación influye sobre las características de los vinos.

Los polifenoles se caracterizan por tener una molécula fenólica en su composición, que consiste en un anillo bencénico con al menos un sustituyente hidroxilo (Figura 1). Se encuentran en todos los órganos de las plantas con estructuras químicas muy variadas y cada planta tiene una composición polifenólica determinada que está condicionada por factores agronómicos y ambientales (Cheynier, 1998). Varían desde compuestos relativamente sencillos producidos por las vides, hasta sustancias complejas formadas durante el envejecimiento, así como otras extraídas por el vino de la madera de los barriles, de las duelas o de los chips. Proviene en su mayoría de las partes sólidas de la uva (hollejos, pepitas o raspones), y en menor medida de la pulpa.

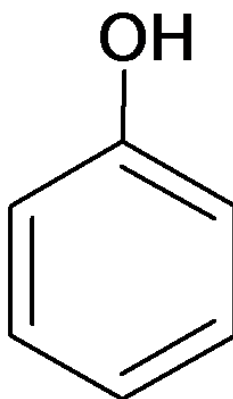


Figura 1: Anillo fenólico

Además, en los últimos años se ha visto que pueden tener un interés nutricional y farmacológico debido a sus propiedades antioxidantes, que están relacionadas con la capacidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre.

Los compuestos polifenólicos se dividen en flavonoides y no flavonoides. Entre los primeros se encuentran los ácidos fenólicos y los estilbenos. En el segundo grupo se incluyen los flavonoles, las antocianinas y los taninos. Dentro de cada uno de estos grupos existen sustancias de gran importancia enológica.

1.2.1. Compuestos no flavonoides

En este grupo se encuentran los ácidos fenólicos, divididos en ácidos benzoicos (C6-C1) y ácidos cinámicos, portadores de una cadena lateral insaturada (C6-C3), pero también a otros derivados fenólicos como los estilbenos.

1.2.1.1 Ácidos fenólicos

En los vinos tintos el contenido de ácidos fenólicos suele ser mayor (100-200 mg/l) que en vinos blancos (10-20 mg/l). Se caracterizan por tener sólo un anillo bencénico. Son incoloros, inodoros e insípidos, aunque si se oxidan pueden volverse de color amarillo. Asimismo, bajo la acción de algunos microorganismos, pueden transformarse en fenoles volátiles que presentan olores muy característicos.

Se dividen en ácidos cinámicos y benzoicos.

Los ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico pertenecen a los cinámicos (Figura 2). En el vino el ácido caféico es uno de los más importantes, reacciona con la polifenoloxidasas produciendo quinonas que a su vez pueden oxidar otros compuestos. Esto puede servir para ver la oxidación de vino, porque cuando hay poca cantidad de este ácido es porque el vino ha sufrido una oxidación excesiva.

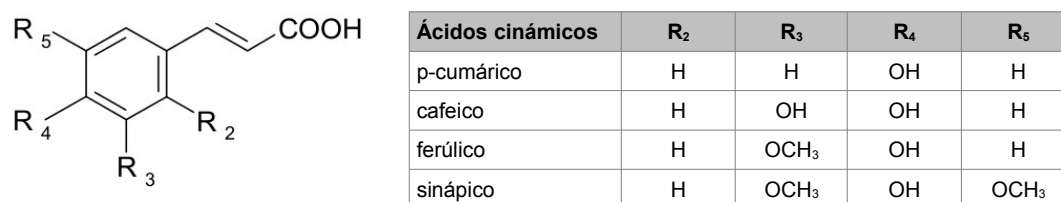


Figura 2: Principales ácidos cinámicos

Los ácidos hidroxycinámicos están esterificados en su mayor parte con ácido tartárico (Ribereau Gayon, 1965) y se encuentran en la piel y en la pulpa. La concentración de éstos disminuye durante el desarrollo de la baya y se estabiliza en la madurez enológica (Romeyer et al, 1983).

La presencia de ésteres tartáricos y la ausencia de ésteres quínicos son características del género *Vitis* si se compara con otras frutas.

Los ácidos benzoicos son derivados del ácido p-hidroxibenzoico y en la Figura 3 se pueden ver los más importantes en enología.

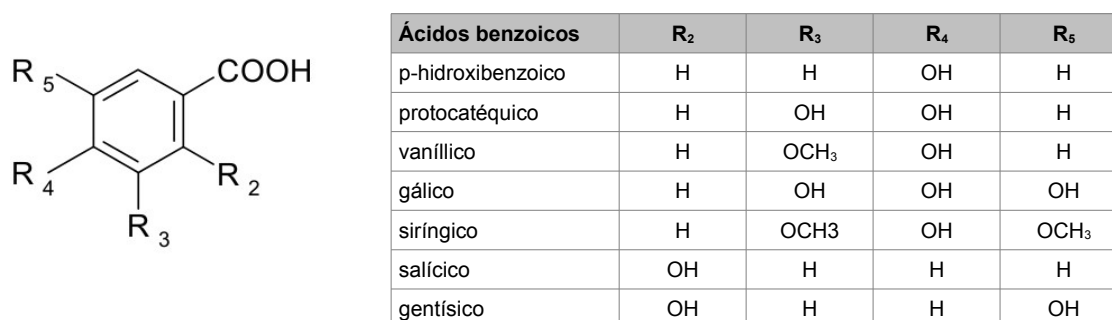


Figura 3: Principales ácidos benzoicos

Existe cierta discusión entre diferentes autores acerca de si estos ácidos se encuentran libres en la

uva o si son liberados durante la vinificación. Aunque parece demostrado que existen en forma esterificada y que son liberados por hidrólisis alcalina en el curso de la elaboración y conservación del vino (Ribéreau-Gayon,1976).

Entre los ácidos benzoicos el ácido gálico es importante en enología, se encuentra en las semillas como ésteres de procianidinas (galocatequinas y epigalocatequinas) y también en forma libre. Pasa al vino como éster y también como monómero y en los vinos tintos es uno de los más abundantes.

1.2.1.2. Estilbenos

Se caracterizan por tener dos ciclos bencénicos unidos generalmente por una cadena etanol o eventualmente etileno (Ribereau-Gayon et al, 2003). Entre estos compuestos, destaca el resveratrol (3, 5, 4´- trihidroxiestilbeno) (Figura 4) bajo forma trans y su derivado glucosilado. Este compuesto no sólo destaca por sus propiedades antioxidantes sino por su efecto protector frente a enfermedades cardiovasculares (Moreno, 2010).

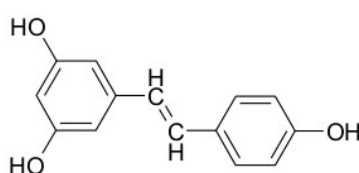


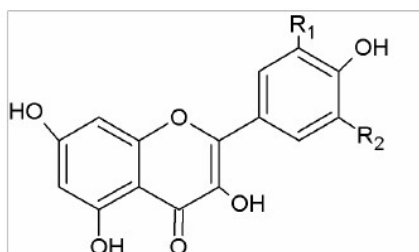
Figura 4: Resveratrol

1.2.2. Compuestos flavonoides

Tienen un importante papel a nivel sensorial, dentro de este grupo están los flavonoles, las antocianos y los taninos. La molécula básica de estos compuestos se compone de un esqueleto de 15 átomos de carbono del tipo 2-fenil benzopirona. Se trata de dos anillos bencénicos unidos por un heterósido oxigenado.

1.2.2.1. Flavonoles

Se encuentran solo en los hollejos, tanto de uvas tintas como de blancas y son de color amarillo. En la uva se diferencian principalmente cuatro flavonoles (Figura 5). Se han observado grandes diferencias de composición entre las variedades tintas y blancas pero en el plano de la riqueza global no se distinguen (Cheynier y Rigaud, 1986).



Flavonoles	R ₁	R ₂
Kemferol	H	H
Quercetol	OH	H
Miricetol	OH	OH
Isoramnetol	OCH ₃	H

Figura 5: Principales flavonoles del vino

Se producen prácticamente durante todo el proceso de crecimiento de la baya y protegen a la planta contra las radiaciones ultravioletas. Sus contenidos varían en función de situaciones restrictivas que parecen estar relacionadas con la insolación y el estrés hídrico (Ojeda, 1990).

Parecen tener un gusto amargo y una leve astringencia y son buenos copigmentadores (Dadic y Belleau, 1973). Una propiedad importante de los flavonoles es su capacidad para actuar como fuertes copigmentos formando complejos con los antocianos favoreciendo la disolución y la retención de éstos en el vino, lo se traduce en un aumento del color (Boulton, 1999).

1.2.2.2. Flavononoles y flavonas

Tienen una estructura similar a los flavonoles, la única diferencia es que no poseen el doble enlace del heterociclo.

1.2.2.3. Antocianos

Los antocianos (del griego anthos=flor y kyanos=azul) están muy difundidos en el mundo vegetal. Son los responsables de la mayor parte de los colores rojos de las plantas y de las flores. Se forman a partir del envero y la cantidad presente se ve fuertemente influenciada por las restricciones hídrica, los rendimientos, el vigor de la planta, la temperatura, la exposición del follaje y las características del suelo. (Ojeda, 1990). Están localizadas en las vacuolas de las células del hollejo y también en las tres o cuatro primeras capas celulares de la hipodermis.

Su estructura está formada por dos anillos bencénicos unidos por medio de un anillo heterocíclico y presentan variantes en algunos carbonos de los anillos bencénicos o en el anillo heterocíclico. Este último anillo puede ser del tipo pirano o del tipo pirilio.

En dicho grupo pirilio se observa el oxígeno tetravalente con una valencia libre que confiere carácter iónico a la molécula entera del antociano. El grupo constituido por el primer anillo bencénico ligado con el grupo pirilio recibe el nombre de grupo benzopirílico. Este grupo unido a su vez con el segundo anillo bencénico, se llama conjuntamente catión flavilio.

Estos compuestos no existen en la naturaleza bajo forma antocianidina, pero sí bajo forma antocianina, dado que las antocianidinas están siempre esterificadas con una o más moléculas de un azúcar que les confiere estabilidad. Este complejo esterificado es el que toma el nombre de antocianina o antociano. Es decir, químicamente los antocianos son los glicósidos de las antocianidinas, y éstas son, por tanto, las agliconas de los antocianos. Las agliconas (antocianidinas) de los antocianos presentan en varios carbonos grupos hidroxilo (OH) y a veces grupos metoxilo (OCH₃). En la Figura 6 se muestra la estructura química de las principales antocianidinas.

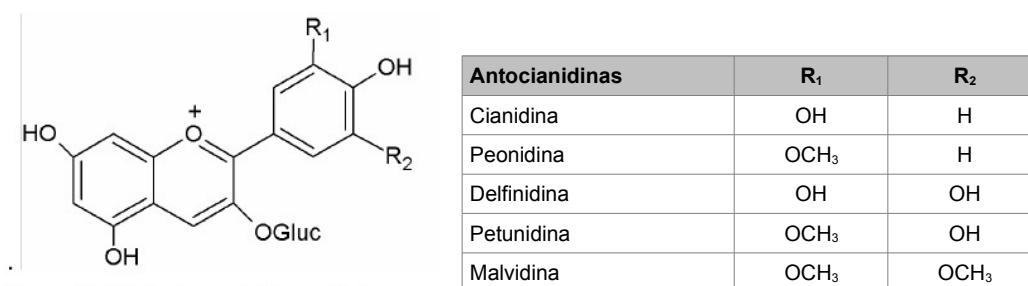


Figura 6: Principales antocianidinas

Como se dijo anteriormente, en la naturaleza las antocianidinas se encuentran siempre como glicósidos. La glicosilación puede ocurrir en las posiciones 3, 5 y 7. El azúcar que participa con mayor frecuencia es la glucosa, aunque existen además, otros azúcares que participan en estos enlaces como ramnosa, galactosa y arabinosa. Según que la esterificación afecte a uno, dos o tres carbonos, los antocianos se llaman monoglicósidos, diglicósidos o triglicósidos. En la Figura 7 puede observarse la estructura de las antocinidinas glicosiladas con una molécula de glucosa.

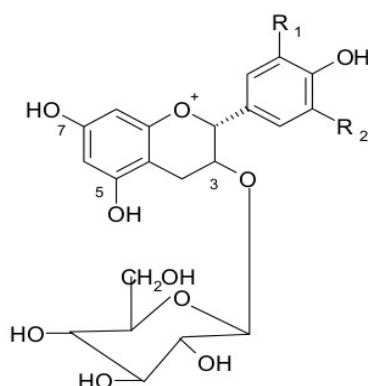


Figura 7: Estructura de las antocianinas 3-monoglucosiladas

Los antocianos monoglucósidos están presentes en todas las especies conocidas del género *Vitis vinifera*.

Existe otra categoría de antocianos naturales que son los antocianos acilados y se caracterizan porque en ellos la misma molécula de azúcar que esterifica a la aglicona es a su vez esterificada por un ácido orgánico, frecuentemente el ácido acético y ácidos fenólicos, como el ácido p-cumárico y a veces el ácido cafeico o el ácido clorogénico. Un ejemplo de una de estas moléculas es la que puede observarse en la figura siguiente:

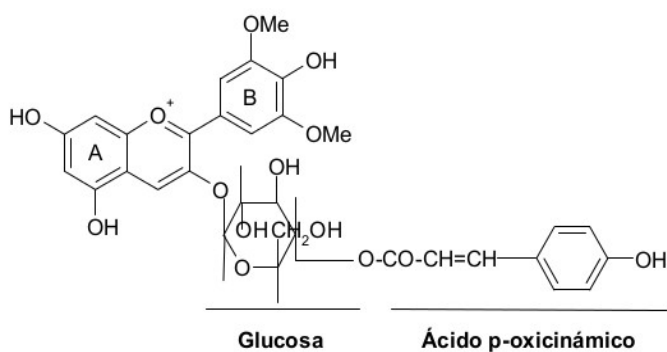


Figura 8: Formación del p-cumarato-3-monoglucósido de malvidina

En estos compuestos destacan sus propiedades cromóforas. El color de estos pigmentos tienen que ver con las condiciones del medio (pH, SO_2), de la estructura molecular y del medio ambiente. Así, la sustitución del ciclo lateral genera un desplazamiento batocromo de longitud de onda de absorción máxima

(color malva), mientras que la fijación de la glucosas y la acilación desplazan el color en sentido inverso, hacia el naranja. Por lo tanto, el pH es un factor fundamental en el color final; a pH inferiores a 2, el color rojo domina ampliamente pero al aumentar este valor el color rojo desaparece. Debido a estos cambios se explican los diferentes colores de las bayas de las uvas tintas a pesar de que todas las variedades presenten las mismas estructuras antocianídicas de base con pequeñas desviaciones de composición.

El fenómeno de la copigmentación se debe a asociaciones moleculares entre antocianas y otras moléculas orgánicas en solución, llamadas por ello copigmentos, entre los que podemos citar a algunos flavonoles como la miricetina, el ácido caféico y otros. Tiene como consecuencia un desvío del color hacia el violeta (batocrómico) y también un aumento del color (hipercrómico), formando complejos inestables con las antocianas favoreciendo la disolución y retención de las mismas en el vino, lo que implica un mayor color y un mayor matiz violeta en el vino .

Se trata de un apilamiento entre antocianos y copigmentos contenidos por interacciones hidrofóbicas y por lo tanto perturbados por la dilución. Protege al núcleo flavilio de las antocianas contra un ataque nucleófilo del agua (Brouillard et al., 1989). Los flavonoles tienen gran capacidad para actuar como copigmento (Boulton, 1999).

La forma copigmentada sería responsable de al menos el 40% del color de los vinos jóvenes y varía con los diferentes cepajes. Así el Pinot Negro tiene baja copigmentación y se lo atribuye al hecho de no tener antocianas aciladas que son las que participan en el proceso de copigmentación puro. En cambio en otros como el Syrah y el Merlot y según este autor es mayor este fenómeno (Boulton, 1999).

1.2.2.4. Flavonoles

Los flavonoles son una compleja familia compuesta por diferentes formas isoméricas de la catequina y sus polímeros. Tienen capacidad para interactuar con las proteínas y con otros polímeros vegetales como los polisacáridos. Este tipo de moléculas son relativamente voluminosas. Las masas moleculares pueden estar comprendidas entre 600 y 3500 (Cheynier et al., 2003).

Según la naturaleza de las moléculas elementales, se pueden clasificar en dos grandes grupos: los taninos hidrolizables (o gálicos) y los taninos condensados). Los taninos contenidos naturalmente en la uva y en los vinos pertenecen sobre todo al segundo grupo, mientras que los presentes en la madera de las barricas, chips, duelas, etc. en el corcho y gran parte de los taninos enológicos utilizados como aditivos con fines tecnológicos o los presentes son del primer grupo.

Los taninos hidrolizables comprenden a los galotaninos y a los elagitaninos, liberando por hidrólisis ácida respectivamente ácido gálico (Figura 9) y ácido elágico (Figura 10), ambos tienen una molécula de glucosa. Los más abundantes pertenecen a los elagitaninos.

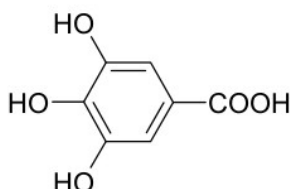


Figura 9: Ácido gálico

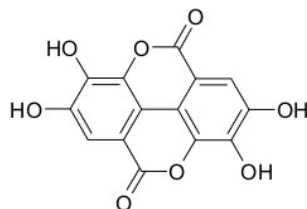
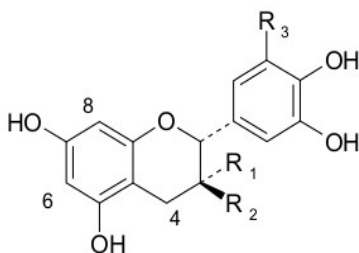


Figura 10: Ácido elágico

Los taninos condensados son polímeros mas o menos complejos de flavan-3-oles o 3-flavanoles, también llamados catequinas. En la Figura 11 se representan los principales monómeros de flavanol:



Monómeros	R ₁	R ₂	R ₃
Catequina	H	OH	H
Galocatequina	H	OH	OH
Epicatequina	OH	H	H
Epigalocatequina	OH	H	OH

Figura 11: Principales monómeros de flavanol.

La estructura básica de la catequina presenta 2 carbonos asimétricos por lo que existen 4 isómeros : (+)/(-) catequina y epicatequina. Además el anillo aromático externo puede presentar un tercer grupo OH, dando lugar a las correspondientes (+)/(-) galocatequina y epigalocatequina. Por otra parte el grupo OH en posición 3 del heterociclo (C) puede estar galoilado, es decir, que puede estar esterificado con una molécula de ácido gálico, por lo que también se pueden incluir los 3-galatos de (+)/(-) (galo)catequina y epi(galo)catequina.

Por lo tanto existen hasta 16 posibles monómeros de flavanol. Aunque en la uva la mayoría son la (+)-catequina, la (-)-epicatequina y el 3-galato de (-)-epicatequina. No obstante, los monómeros de flavanol representan tan sólo una pequeña parte, ya que la mayor parte de flavanoles están en forma de polímeros.

Los flavanoles polímeros reciben el nombre de taninos condensados y corresponden a cadenas de

diferente número de unidades de los diferentes flavanoles monómeros mediante enlaces C_4-C_8 o C_4-C_6 . A los polímeros de flavanol o taninos condensados, se les denomina proantocianidinas o procianidinas, debido a que en medio fuertemente ácido dan lugar, por hidrólisis, a cianidina. No obstante en el caso de que el polímero esté formado por unidades galocatequina y/o epigallocatequina se obtendría por hidrólisis ácida de la delfinidina y por tanto se hablaría de prodelfinidinas. Aunque para simplificar la nomenclatura la mayoría de autores incluye dentro del término procianidinas a todos los taninos condensados, es decir tanto a las procianidinas como las prodelfinidinas.

Las procianidinas son las responsables del sabor amargo y de la astringencia del vino, pero también de parte de la componente amarilla del color, de la sensación “cuerpo” del vino y de la capacidad del vino para envejecer. Los taninos reaccionan mediante diferentes mecanismos (condensación directa, o condensación mediada por el acetaldehído) con los antocianos para generar nuevos pigmentos, por lo general más estables que los antocianos primitivos. Este tipo de pigmentos son solo parte de los diferentes nuevos pigmentos que se producen a lo largo de la fermentación, conservación y crianza del vino, y que son los responsables de la evolución del color del vino desde las tonalidades rojas-violáceas en los vinos jóvenes hacia los matices tejas y anaranjados de los vinos envejecidos. Así mismo los taninos reaccionan entre sí y con otros componentes (distintos a los antocianos) del vino. Estos procesos provocan cambios a lo largo de la vida del vino en las propiedades de amargor, astringencia, y “cuerpo” del vino.

1.3. LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LOS VINOS

Si se compara la composición fenólica de la uva y el vino se ve que junto a las moléculas que proceden de la baya se ven en el vino otra clase de fenoles. Estos constituyentes específicos del vino comprenden los compuestos procedentes de las etapas fermentativas, pero también numerosos productos resultantes de la evolución de los polifenoles propios de la baya de uva. Durante la vinificación y el envejecimiento, estos últimos participan en diversas reacciones, dando lugar a múltiples estructuras nuevas. Además, en los vinos que han permanecido en barrica o que se les haya añadido madera (chips, duelas, etc.), se puede notar la presencia de constituyentes extraídos de la madera utilizada durante la crianza.

Por tanto, se puede decir que los procesos de vinificación conducen a medios (mosto, vino) en continua evolución. Así, la composición fenólica del vino depende a la vez de la materia prima y del tipo de vinificación adoptado, que influye por una parte sobre fenómenos físicos como la difusión de compuestos desde las partes sólidas hacia el mosto, o la extracción de compuestos de las barricas; y por otra parte, influye sobre fenómenos bioquímicos y químicos en los cuales están implicados los polifenoles (oxidación, degradación, condensación).

1.3.1. Fenómenos de difusión y extracción

Debido al reparto de las diferentes clases de polifenoles en el racimo, y de sus respectivas solubilidades, la maceración, indispensable para la extracción del color durante la elaboración de los vinos tintos, y, más concretamente, las etapas de vinificación que favorecen la disolución de flavonoides, determinan la composición fenólica de los vinos. Así, los ácidos hidroxicinámicos, que son los principales constituyentes fenólicos de la pulpa son también los compuestos mayoritarios de los vinos blancos, mientras que los vinos resultantes de una maceración encierran igualmente fuertes proporciones de flavonoides, provenientes de las partes sólidas del racimo.

El fenómeno de difusión comienza en el estrujado de la uva y se prolonga hasta el prensado. Esta difusión depende de diferentes factores como el contenido en SO_2 , la temperatura, el porcentaje de etanol, y la homogeneización del mosto (Ribéreau-Gayon et al., 1976).

Algunos estudios demuestran que el contenido global de compuestos fenólicos, expresados en equivalentes de ácido gálico, varían entre 800 mg/l y 4 g/l en vinos tintos (Singleton y Noble, 1976). Mientras que la tasa media de paso de polifenoles totales es del 60% (Günata et al., 1986), y de antocianos y taninos, respectivamente, del 38% y 20% (Augustín, 1986). Los taninos y los antocianos presentan cinéticas de extracción diferentes. Los antocianos son extraídos rápidamente, alcanzando una concentración máxima los primeros días, ya que se degradan lentamente, mientras que los taninos son extraídos con un tiempo de latencia, por lo que va aumentando su concentración progresivamente con el tiempo de contacto. Estas diferencias de cinética de extracción podrían estar ligadas a las solubilidades relativas de las diferentes especies moleculares o resultar de una mejor accesibilidad de los taninos de los hollejos. En la Tabla 1 se puede ver la composición media de diferentes tipos de vinos.

Tabla 1: Composición media de un vino blanco y de un vino tinto (Flanzy, 2003)

	VINO BLANCO	VINO TINTO
Ácidos benzóicos	1-5	50-100
Ácidos cinámicos	50-200	50-200
Flavonoles	trazas	15
Antocianos	0	20-500
Flavanoles monómeros	trazas	150-200
Procianidinas	0-100	1.500-5.000
Expresado en mg/l		

1.3.2. Modificaciones de los compuestos fenólicos durante la vinificación

Los fenómenos de degradación y evolución de los polifenoles que se producen durante la vinificación son regidos principalmente por dos tipos de mecanismos. El primero hace intervenir reacciones bioquímicas catalizadas por diferentes enzimas, mientras que el segundo se trata de reacciones químicas.

1.3.2.1. Reacciones bioquímicas

A lo largo del proceso de vinificación, los compuestos fenólicos experimentan modificaciones debidas a los enzimas endógenos o exógenos de las uvas. El principal enzima de la uva que degrada los polifenoles es la polifenoloxidasas. Las actividades enzimáticas consideradas como exógenas son de diversa naturaleza y pueden provenir de microorganismos presentes durante la vinificación o de preparaciones enzimáticas enológicas.

1.3.2.2. Reacciones químicas

Reacciones de adición de los antocianos y de los taninos

El color, la astringencia, y el amargor de un vino son esencialmente debidos a las sustancias fenólicas y a los productos de sus reacciones. En los vinos tintos, el color evoluciona constantemente durante la maduración y el envejecimiento, pasando de un color rojo violáceo a un tinte teja. Estas modificaciones visuales se acompañan de una pérdida de la astringencia y se deben a fenómenos de adición, transformando los compuestos fenólicos de la uva (antocianos y flavanoles concretamente) en otras especies moleculares.

La ausencia de correlación entre la intensidad de color y la concentración de antocianos libres ha llamado la atención de numerosos investigadores (Glories, 1978; Somers, 1971; Timberlake y Bridle, 1976). Según Somers (1971), las formas libres, que contribuyen la totalidad de los pigmentos de la uva, son poco a poco reemplazadas por formas coloreadas poliméricas que contribuyen en un 50% al color de un vino después de un año de conservación y en un 85% al de un vino de diez años. Así, a excepción de los fenómenos de copigmentación, el color del vino es debido a la presencia, además de los antocianos libres, de combinaciones “polifenol-antocianos” y más particularmente de tipo “tanino-antociano” y de taninos condensados (Ribéreau-Gayon, 1982; Glories, 1978).

Se cree que las combinaciones taninos-antocianos pueden existir ya en la uva (Glories, 1978; Guillox, 1981), pero es más probable que las reacciones comiencen durante la liberación de los compuestos fenólicos de las bayas en el estrujado y al principio de la fermentación (Bakker et al., 1986).

Estudios han mostrado la presencia en los vino de nuevos pigmentos como resultado de la condensación de los antocianos con el 4-vinifenol. Estas moléculas han sido caracterizadas como adiciones de antocianos debido a ciclaciones entre las posiciones 4-5 del antociano y la doble unión del vinifenol. Estos nuevos compuestos son anaranjados y presentan una estabilidad y una resistencia a la decoloración por los iones bisulfito, confirmando el papel de las sustituciones en C4 del antociano en el establecimiento de pigmentos estables y color (Sarni- Manchado et al., 1996).

Estos pigmentos, denominados piranoantocianos, presentan características muy particulares. Se forman por reacciones de combinación con los antocianos dando lugar a oligómeros estables a partir de sustituciones en C-4, es decir por inclusión en el antociano de un cuarto anillo pirano. No están presentes en la uva, sino que se forma durante la fermentación alcohólica y en las posteriores etapas de elaboración. Su concentración es menor que la de otros pigmentos. Estos compuestos son muy poco sensibles a los cambios de pH y la decoloración con SO₂ y son químicamente muy estables. Contribuyen al color rojo anaranjado del vino (Romero y Bakker, 2000).

Dentro de este grupo, también están las vitisinas. La vitisina A se forma por cicloadición de una molécula de ácido pirúvico sobre una molécula de antociano, y fue uno de los primeros pigmentos encontrados en el vino (Bakker, 1985). Se forma rápidamente y es uno de los piranoantocianos que se detecta precozmente en vinos jóvenes, aunque se puede generar constantemente a lo largo de la vida del vino, siempre y cuando existan en el medio antocianos monoméricos y ácido pirúvico (Morata et al, 2006).

La vitisina B se forma por cicloadición de una molécula de acetaldehído sobre una molécula de antociano. El acetaldehído reacciona preferentemente con los antocianos acetilados, y en menor medida con lo cumarilados.

La formación de ambas vitisinas parece seguir una cinética antagónica, ya que el acetaldehído podría competir con el ácido pirúvico por la molécula de antociano. Los antocianos también pueden reaccionar con los vinifenoles, procedentes de descarboxilación de los ácidos hidroxicinámicos, y con unidades de flavanol-etilo o vinil-flavanol.

Reacciones de oxidación de los polifenoles en los vinos

La autooxidación de los polifenoles en medio modelo de vino es un fenómeno muy lento en ausencia de catalizadores. Las velocidades de estas reacciones son más rápidas cuando el pH de las soluciones aumenta debido a la mayor proporción de moléculas en forma de fenolato (Singleton, 1987; Cilliers y Singleton, 1989). Así, se han obtenido y clasificado varios productos de autooxidación de los polifenoles y se ha demostrado que la autooxidación de ácido galico genera ácido elágico (Tulyathan et al., 1989), esto podría explicar la presencia de este compuesto en vinos que no han permanecido en toneles. En el caso de la

catequina se han obtenido los mismos productos por autooxidación por oxidación enzimática, aunque a velocidades muy diferentes (a los tres meses y después de una hora respectivamente) (Oszmianski et al., 1996). En el caso del ácido cafeico, los dos tipos de oxidación han conducido a la vez a productos idénticos y a compuestos aparentemente específicos de uno o de otro (Cilliers y Singleton, 1991; Cheynier y Moutonet, 1992). De todos modos, es probable que las variaciones de composición observadas entre los modelos estudiados sean debidas sobre todo a efectos cinéticos, relacionados con las proporciones relativas de formas oxidadas (o-quinonas) y no oxidadas en las soluciones y a la influencia del pH sobre las velocidades de las etapas reactivas en las que cada producto se forma o se degrada (Fulcrand et al., 1994; Guyot et al., 1996). Excepto el ácido elágico, ninguno de estos productos han sido encontrados en los vinos, esto es debido a la gran diversidad de reacciones existentes.

1.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se ha comprobado que varias patologías como el cáncer o la artritis, están asociadas con daños oxidativos (Urquiaga et al., 1999), por lo tanto, las defensas antioxidantes de nuestro organismo son indispensables para preservar nuestra salud.

Un porcentaje del oxígeno que consumimos forma especies reactivas de este elemento, siendo alguna de ellas radicales libres. Cuando la generación de especies reactivas sobrepasa las defensas antioxidantes naturales del organismo se llama estrés oxidativo y produce un daño en las estructuras biológicas del organismo.

La mayoría de polifenoles son potentes antioxidantes y son necesarios para el funcionamiento de las células vegetales de frutas y verduras, pero también se pueden encontrar en el té y el vino (Kinsella et al., 1995). El vino tinto puede contener entre 1.000 y 4.000 mg/l de distintos tipos de polifenoles (Bravo, 1998). Los vinos tintos tienen una alta capacidad antioxidante y esta propiedad está relacionada con su contenido en flavanoles (Teissedre, 1996), antocianos (Ghiselli et al., 1998) y ácido tartárico (Larrauri et al., 1999), aunque se cree que las propiedades antioxidantes del vino tinto están relacionadas con la concentración de polifenoles totales (Frankel et al., 1995) más que con la concentración de cada compuesto individual. En estudios in vitro, se ha observado que muchos polifenoles naturales son mejores antioxidantes que las vitaminas E y C (Leighton et al., 1999). Además inhiben la acción de los metales como catalizadores en la formación de radicales libres ya que pueden quelar metales, especialmente hierro y cobre (Yang et al., 2001).

En el vino la capacidad antioxidante no es simplemente la suma de las capacidades antioxidantes de

cada uno de sus componentes, también está determinada por la interacción entre ellos, se pueden producir efectos sinérgicos o inhibitorios.

En 13 vinos italianos típicos se estudió la composición fenólica en relación con su actividad antioxidante total, y se vio que existe una alta correlación entre el contenido fenólico de los vinos y la actividad antioxidante total, siendo los vinos tintos más antioxidantes que los blancos. Parece ser que la absorción de los polifenoles es limitada, y que se produce una extensa degradación en el tracto digestivo. En consecuencia, los polifenoles pueden actuar en el tracto digestivo limitando la formación de especies reactivas del oxígeno o bien capturándolas debido a su gran potencial de reducción. Por lo tanto, las vitaminas C, E y β caroteno son protegidas del ataque de los radicales libres, y debido a su buena biodisponibilidad pueden ser absorbidas por los tejidos, aumentando así el status antioxidante del cuerpo (Simonetti et al, 1997).

Se ha determinado que la actividad antioxidante de los jugos de uva y de vinos parece basarse en su capacidad para capturar radicales libres. Los vinos tintos, debido al proceso de maceración, tienen mayor actividad antioxidante que los jugos de uva que los originan (Sánchez Moreno et al, 1999). También se ha verificado que a mayor concentración de fenoles totales, mayor es la actividad antioxidante (Baderschneider et al, 1999).

El creciente interés por los posibles efectos beneficiosos de los antioxidantes ha hecho que se desarrollen una gran cantidad de métodos para determinar la capacidad antioxidante de los alimentos. Muchos autores afirman que existe una correlación positiva entre el contenido polifenólico total y la capacidad antioxidante de un alimento (Alonso, 2002; Muller, 2010), otros autores afirman que existe relación entre algunos grupo de compuestos individuales y la actividad antioxidante (González-Paramás, 2004) mientras que otros no han observado una correlación significativa entre ambos parámetros (Sun, 2011; Al-Duais, 2009). Hay compuestos antioxidantes que no reaccionan con determinadas especies oxidantes y sí con otras pudiéndose obtener así valores diferentes entre los distintos métodos (Fernández-Pachón, 2006). Por ello, cuando se estudia la actividad antioxidante del vino es aconsejable emplear varios métodos, ya que cada uno puede ofrecer información diferente.

En los siguientes puntos se van a describir los métodos utilizados en este estudio para determinar la capacidad antioxidante del vino, los métodos DPPH y FRAP. Además también se describe el método Folin-Ciocalteu que se ha utilizado para conocer el contenido polifenólico de las muestras, a pesar de que no es un método en sí de medida de capacidad antioxidante en muchas ocasiones se considera un método más por el importante papel de los polifenoles en ella.

1.4.1. Método DPPH

El radical DPPH es un radical orgánico nitrogenado de color morado. Este método fue propuesto por Brand-Williams en 1995 y se basa en la reducción de este radical por los antioxidantes u otros compuestos reductores, convirtiéndolos en hidracina, que es una sustancia de color amarilla. Se puede medir la reducción de absorbancia a 515-528 nm (Karadag, 2009) y el porcentaje de DPPH que no ha sido reducido se puede calcular mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{rem}} = 100 \times [\text{DPPH}]_{\text{rem}} / [\text{DPPH}]_{t=0}$$

Los resultados se expresan en equivalente de Trolox ($\mu\text{mol Trolox/g}$ o $\mu\text{mol Trolox/l}$), tras elaborar una curva de calibrado de este compuesto, un análogo hidrosoluble de la vitamina E muy utilizado en la expresión de resultados de capacidad antioxidante.

A pesar de que el método propuesto por Brand-Williamns se llevaba a cabo mediante cubetas, se ha demostrado la posibilidad de llevar a cabo este proceso mediante microplacas (Herald, 2012). Sin embargo, Bobo et al.(2014) han observado que el método realizado mediante microplacas sólo es estadísticamente equivalente al método de cubetas cuando las muestras analizadas se sitúan en un intervalo de concentración equivalente a 220-320 μM Trolox.

El DPPH sólo puede ser disuelto en medios orgánicos (especialmente alcoholes) y no en medios acuosos, lo cual supone una importante limitación al interpretar el papel de los antioxidantes hidrofílicos (Arnao, 2000).

1.4.2. Método FRAP

Se basa en la habilidad de los compuestos fenólicos para reducir el complejo de la tripiridiltriazina férrica (Fe(III)-TPTZ), de color amarillo, al complejo ferroso (Fe(II)-TPTZ), de color azul, mediante la donación de electrones (Benzie et al, 1999). El color azul resultante se puede medir mediante el espectrofotómetro a una longitud de onda de 593 nm a los 4 minutos del comienzo de la reacción obteniéndose una relación lineal respecto a su capacidad de donar electrones. Al igual que el método DPPH los resultados se expresan en equivalentes de Trolox.

Un inconveniente de este método es que considera la capacidad de una sustancia de reducir Fe(III) es equivalente a la de su actividad antioxidante, pero no todos los compuestos capaces de reducir Fe(III) tienen propiedades antioxidantes (Prior et al, 1999) ya que cualquier sustancia sin actividad antioxidante con un

potencial redox menor que el par Fe(III)/Fe(II) puede aumentar el valor de FRAP. Además, no todos los antioxidantes son capaces de reducir Fe(III) , como por ejemplo el GSH, un importante antioxidante in vivo que no puede ser medido mediante este método.

1.4.3. Método Folin-Ciocalteu

Como ya se ha comentado anteriormente, no es un método de medida de la capacidad antioxidante, sino de contenido en polifenoles, pero como éstos juegan un papel importante en la actividad antioxidante de los alimentos, se utiliza como un método más. La naturaleza exacta del reactivo Folin-Ciocalteu no es conocida pero está aceptado que contiene ácidos fosfomolibdicos/fosfotúngicos complejos (Karadag et al, 2009). Este método se basa en la transferencia de electrones en medios alcalinos desde los compuestos fenólicos y otros compuestos reductores hacia el molibdeno, formando compuestos azules que pueden ser medidos espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750-765 nm (Magalhaes et al, 2008).

Se ha demostrado la posibilidad de llevar a cabo este método mediante microplacas (Al-Duais, 2009). Sin embargo, Bobo et al. (2014) han observado que el método realizado mediante microplacas sólo es estadísticamente equivalente al método de cubetas cuando las muestras analizadas se sitúan en un intervalo de concentración equivalente a 10-70 mg de ácido gálico por litro.

1.5. EL COLOR DEL VINO

El color es uno de los aspectos organolépticos más importantes de un vino, no sólo por ser su primera e inmediata imagen, sino también porque es un indicador de otros aspectos relacionados con su aroma y con su sabor. Así por el color de un vino podemos tener una idea de su edad, de su concentración tánica, de su estado de conservación, e incluso podemos adivinar algunos defectos que después se notarán al beberlo.

El color del vino tinto, así como una parte importante de las características que definen su calidad, están en gran medida relacionadas con su composición en compuestos fenólicos. De todos ellos, los antocianos y los flavanoles son los que mayor influencia tendrán sobre el color, su evolución y otras características organolépticas que definen el vino.

Los antocianos extraídos de las partes sólidas de la uva, especialmente de la piel, le dan al vino el

color rojo, mientras que la presencia de otros compuestos (llamados copigmentos), normalmente incoloros, permiten mejorar la estabilización del color en los vinos envejecidos (Pérez-Magariño y González-San José, 2004) mediante reacciones de copigmentación, que son interacciones covalentes entre antocianos y copigmentos, que dan lugar a pigmentos poliméricos mayores (Ribéreau-Gayón et al., 2003). Por ello, el contenido de antocianos desciende significativamente durante el envejecimiento, contrariamente a los pigmentos poliméricos.

Como ya se ha comentado en el primer párrafo, el color es uno de los principales atributos de calidad de los vinos tintos. La intensidad del color disminuye con el tiempo, y la tonalidad cambia gradualmente desde el rojo-violeta característico de los vinos jóvenes al rojo-naranja de los vinos muy envejecidos. Esta evolución es debida a las transformaciones ya mencionadas que se han dado en los antocianos, que incluyen diversas interacciones con otros componentes del vino. El color inicial de los vinos tintos es debido principalmente a los antocianos libres o monoméricos, y a los antocianos copigmentados con varios compuestos como son los flavanoles, flavonoles, y los ácidos hidrocínámicos (Boulton, 2001). Cuando el vino va madurando, la cantidad de estos compuestos disminuye en favor de pigmentos más estables como los piranoantocianos.

Por otro lado, según diversos autores, parece probable que algunos componentes de la madera como el ácido elágico o los aldehídos volátiles hacen que disminuya la cantidad de antocianos de acuerdo a los resultados vistos en estudios sobre vinos tintos (De Coninck, Jordao, Ricardo Da Silva y Laureano, 2006) y sobre soluciones modelo (Jordao y Ricardo Da Silva, 2006; Jordao et al., 2008).

1.5.1. Análisis del color

Caracterizar el color de un vino es más difícil de lo que puede parecer. El espectro de absorción de un vino presenta un máximo hacia los 520 nm, que corresponden al color rojo y unas componentes amarilla (420 nm) y azul (620 nm) que determinan un triángulo (Figura 12).

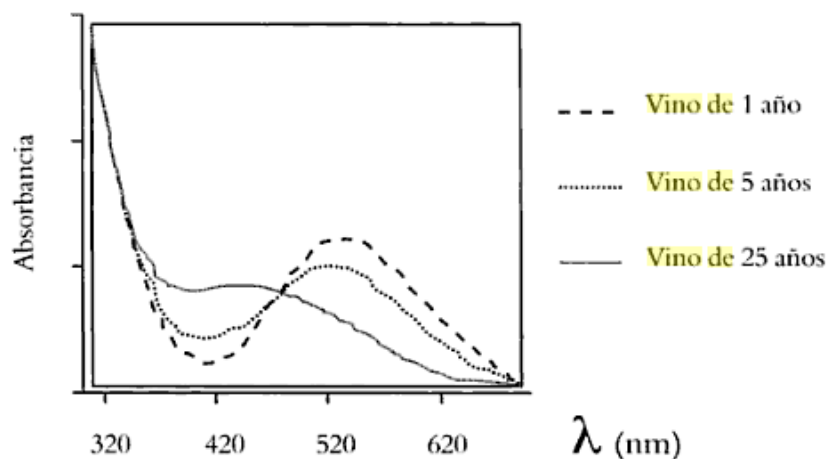


Figura 12: Espectro de absorción de un vino durante el envejecimiento.

Es precisamente este espectro el que definirá el color real del vino, pero su apreciación por parte del consumidor dependerá de otros factores entre los cuales la iluminación con la que se observe y los colores del ambiente en que se encuentre serán determinantes. Aun así, es necesaria la determinación parametrizada del color.

1.5.1.1. Parámetros estándar

Estos parámetros se determinan de acuerdo a la metodología descrita en 1984 por Glories. En una cubeta de 1 mm de camino óptico se miden las absorbancias a 420, 520 y 620 nm, del vino previamente centrifugado. El resultado se multiplica por 10 para referirlo a la cubeta estándar de 10 mm de camino óptico. La intensidad colorante, que da una idea de cuánto color posee el vino, será la suma de cada uno de los componentes:

$$IC = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

La tonalidad, que nos indica la importancia relativa del amarillo sobre el rojo, será el cociente entre A_{420} y A_{520} , expresado en tanto por ciento:

$$\text{Tonalidad (T)} = (A_{420}/A_{520}) \times 100$$

1.5.1.2. Coordenadas cromáticas. Espacio Cielab

En 1976, la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) estableció unas normas, aceptadas hoy en día internacionalmente, destinadas a la correcta definición del color. Estas normas hacen referencia a las características de los iluminantes (iluminante D65), a las condiciones de observación (observador CIE64, de 10° de campo visual) y a las curvas espectrales de sensibilidad del ojo normal para tres estímulos luminosos convencionales denominados X, Y y Z. Estos valores triestímulo representan los tres colores base (X: rojo virtual, Y: verde virtual y Z: azul virtual) con los que se puede reproducir, mediante una combinación, la tonalidad de los colores existentes. Por tanto, estas coordenadas X, Y y Z son en realidad una expresión numérica que representa la proporción relativa de cada uno de los colores base necesaria para reproducir, por el ojo del observador, el color concreto del objeto analizado.

La determinación de estos valores triestímulo se puede realizar, tal y como aconseja la CIE mediante la determinación de la totalidad del espectro y parametrización a intervalos de 10 nm. No obstante esto requiere la utilización de un espectrofotómetro de barrido y la utilización de ecuaciones complicadas. Para simplificar la determinación de los valores triestímulo la OIV recomienda un método simplificado que analiza únicamente tres longitudes de onda. Sin embargo, este método adolece de una cierta falta de precisión. Por esta razón en la actualidad la OIV está analizando la posibilidad de utilizar un método simplificado que aplicando la medida de la transmitancia (expresada en tanto por uno) únicamente a 4 longitudes de onda permite una satisfactoria precisión en la determinación de X, Y y Z.

El cálculo simple de estos valores triestímulo se obtiene tras la lectura de la transmitancia a 450, 520, 570 y 630 nm en una cubeta de 2mm de camino óptico, de acuerdo con lo descrito en las siguientes ecuaciones:

$$X = 19,717 T_{450} + 1,884 T_{520} + 42,539 T_{570} + 32,474 T_{630} - 1,841$$

$$Y = 7,950 T_{450} + 34,764 T_{520} + 42,736 T_{570} + 15,759 T_{630} - 1,180$$

$$Z = 103,518 T_{450} + 4,190 T_{520} + 0,251 T_{570} - 1,831 T_{630} + 0,818$$

La CIE en 1976 definió el llamado espacio CIELAB (Figura 13) en el que se trata de representar en el espacio la totalidad de los colores.

Mediante unas coordenadas L^* , a^* y b^* se puede por tanto definir un color dentro de este espacio CIELAB. Los tres ejes representan las graduaciones entre colores opuestos. Así L^* va desde el blanco al negro, a^* desde el verde al rojo, y b^* desde el amarillo al azul.

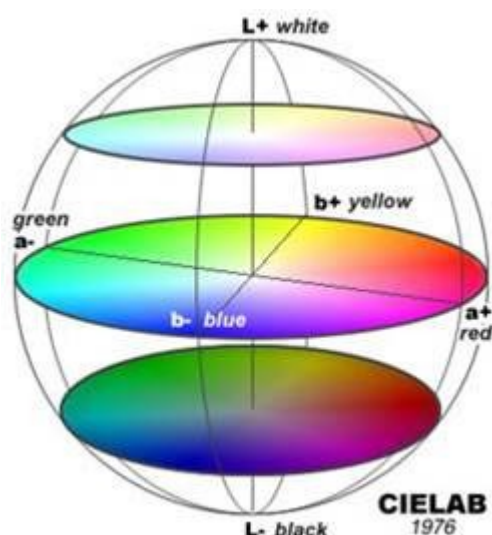


Figura 13: Coordenadas cromáticas, espacio CIELAB.

El cálculo de L^* , a^* y b^* se determina a partir de los valores triestímulo X , Y y Z de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} L^* &= 116 (Y/100)^{1/3} - 16 \\ a^* &= 500 [(X/94,825)^{1/3} - (Y/100)^{1/3}] \\ b^* &= 200 [(Y/100)^{1/3} - (Z/107,383)^{1/3}] \end{aligned}$$

Para simplificar más la expresión del color, las coordenadas a^* y b^* del espacio CIELAB pueden transformarse en las coordenadas esféricas H^* y C^* de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} H^* &= \arctg (b^*/a^*) \\ C^* &= (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \end{aligned}$$

Así el color del vino queda definido dentro del espacio CIELAB, por las tres coordenadas denominadas L^* : claridad, H^* : tono y C^* : croma o saturación.

En definitiva, las coordenadas cromáticas y el espacio CIELAB permiten una definición del color del vino mucho más precisa que los parámetros estándar. No obstante, su aplicación en bodega no se ha

extendido hasta el momento debido a la complejidad de su cálculo y a la dificultad que existe para relacionar la calidad del color del vino con las coordenadas cromáticas.

1.6. LA MADERA Y EL VINO

La conservación del vino en recipientes de madera o el contacto del mismo con ella produce notables modificaciones a nivel del color, del olor, del sabor y de las sensaciones táctiles del vino aportando una notable complejidad al mismo. El uso de la barrica de roble en la crianza de los vinos es una tradición muy respetada, pero desde hace algunos años, la barrica no se considera un simple envase, sino que se considera un elemento favorable en la evolución organoléptica de los grandes vinos.

La madera libera en el vino constituyentes olorosos que aportan matices de maleza, vainilla, clavel, pan tostado, de especias como el clavo y la pimienta, de ahumado, de regaliz, etc (Dubois y Dekimpe, 1982; Dubois, 1989). Además, la oxigenación cuidada permite una evolución favorable de los compuestos fenólicos, tanto desde el punto de vista visual como gustativo (Peyron et al.; 1994).

1.6.1. Madera de roble

La madera de roble es preferida por su adecuada porosidad, que permite un controlado intercambio gaseoso del vino con el exterior y es impermeable a los líquidos; por su maleabilidad que la hace fácil de trabajar, por su resistencia al transporte y por su notable aporte de aroma y taninos a los vinos (Masson 1996). Existen 250 especies de robles, pero solo algunas reúnen las características necesarias para uso enológico. Entre los más conocidos el roble francés que crece en los bosques de Europa, principalmente en Francia; y el roble americano o roble blanco que crece en los bosques de América.

Chatonnet (1993) comparando las sustancias extraídas de madera de roble americana y de roble francés de diferentes orígenes encontró que globalmente el roble americano tiene menos sustancias extraíbles con menor extracción de polifenoles pero en contrapartida aporta un mayor contenido en lactonas, en una cantidad que se considera excesiva.

El roble francés aporta mayor cantidad de sustancias extraíbles y de polifenoles totales pero menor cantidad de lactonas aunque varía con la región de cultivo. Así el roble del centro de Francia es el más apreciado porque tiene contenidos moderados de lactonas, buena cantidad de eugenol (aroma a clavo de

olor) y una también moderada cantidad de polifenoles. En cambio el roble de Limousin aporta excesiva cantidad de polifenoles y tiene un bajo potencial aromático.

Cuando las plantas de roble son más viejas se producen cambios en la madera y la extracción cambia (Figura 14). Las lactonas y la vainillina aumentan hasta la edad de 80 años. Luego las primeras disminuyen y las segundas permanecen constantes. Los elagitaninos disminuyen con la edad. Por ello para no tener una madera cargada de taninos y excesivamente aromática pero sin embargo con buena vainillina, es necesario esperar más de 80 años para cortar la madera (CIVB, 1999).

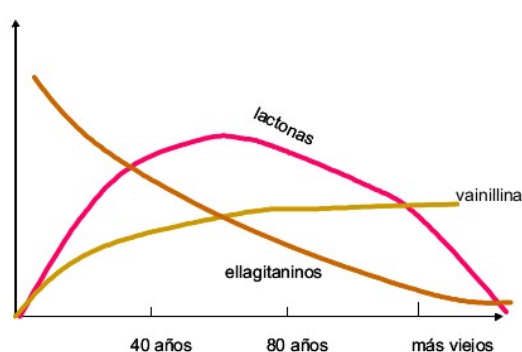


Figura 14: Evolución de algunas sustancias extraíbles del roble francés según la edad del árbol (Adaptado de CIVB 1999).

Las barricas de roble han sido utilizadas desde años en el proceso de elaboración del vino, al principio para almacenarlo y transportarlo; pero luego se vio que la madera de roble tenía efectos positivos en el vino, aportando aromas y regulando el color. Durante el envejecimiento en barricas de roble, la composición cambia por la adición de compuestos fenólicos y otras moléculas extraídas de la madera. Esos compuestos incluyen ligninas, taninos hidrolizables y condensados, ácido gálico, ácido elágico, ácidos aromáticos carboxílicos y varios aldehídos (Chira y Teissedre, 2013).

Los elagitaninos (taninos hidrolizables) se encuentran entre estas sustancias. Representan alrededor del 10% del peso seco de la madera y son los responsables de la alta durabilidad de la madera (Scalbert, Monties y Favre, 1988). Estos compuestos pueden ser hidrolizados, son solubles y poseen actividad antioxidante (Alañón, Castro-Vázquez, Díaz-Maroto, Gordon y Perez-Coello, 2011). Además, tienen efecto sobre la astringencia y el amargor del vino (Glabasnia y Hofman, 2006; Saénz-Navajas, Fernández-Zurbano, y Ferrerira, 2012).

El roble también contiene altas concentraciones de compuestos volátiles que contribuyen al aroma a madera de los vinos. Los principales compuestos volátiles susceptibles de migrar de la madera del roble al

vino son los isómeros *cis* y *trans* de lactona, el furfural y sus derivados, los aldehídos fenólicos, y los fenoles volátiles como eugenol, guaiacol y etil y vinilfenoles.

La extracción de compuestos volátiles de las barricas de roble depende principalmente en la cantidad de compuestos que son potencialmente extraíbles, en el tiempo de contacto entre la madera y el vino, y en la composición del vino. Aun así, los compuestos extraídos por el vino de las barricas se someten a diversas transformaciones, como las microbiológicas, que modifican la concentración de estas sustancias con el tiempo (Spillman, Iland y Sefton, 1998).

En el proceso de producción de las barricas, el roble utilizado debe pasar por varias etapas. Primero se divide la madera en diferentes partes y se procede al secado, para darle resistencia mecánica a las barricas. Después se somete a un proceso de calentamiento, existen diferentes tipos de tostado. Esta etapa es considerada la más importante ya que se cree que tiene mayor influencia en la composición química de la madera de roble. El tratamiento térmico causa la termodegradación de algunos componentes, lo que produce numerosos compuestos volátiles. Los compuestos furánicos se forman a partir de la termodegradación de los carbohidratos, los compuestos fenólicos volátiles vienen de la degradación de la lignina y las lactonas son producto de la deshidratación de los ácidos presentes en la madera. El tostado medio se corresponde a la síntesis máxima de compuestos volátiles (Koussissi et al., 2009).

1.6.2. Alternativas a la madera

Los últimos años se han buscado alternativas a las barricas de roble para el proceso de envejecimiento de vinos. La adición de productos alternativos al vino fue aprobada y legislada hace unos años por la Comunidad Europea (CE 2165/2005 y CE 1507/2006), pero en algunos países como Australia, EEUU, Sur América o Chile, estas prácticas se estaban llevando a cabo desde hace varios años. Se usan diferentes formas de madera de roble como chips, cubos, polvos, virutas y duelas que contribuyen a cambiar organolépticamente al vino. En este caso no existe el intercambio gaseoso (al menos que se combine con una microoxigenación) que existe en la barrica y solo se aprovecha la extracción de taninos y compuestos aromáticos. En función del objetivo que se busca, es necesario adaptar el tipo de madera y el momento de aplicación, aunque en general las dosis oscilan entre 2 y 15 g/l. Al igual que las barricas, el origen de la madera, su acondicionamiento y tostado influyen en las modificaciones sensoriales que producirán en el vino.

Lo que más se maneja para diferenciar los tipos de virutas, copos o “chips” es la intensidad de tostado. Los fabricantes de chips los ofrecen con una amplia gama de propiedades. Se pueden usar maderas sin tostar y entonces aportan al vino principalmente taninos y lactonas con sensaciones de astringencia y sabores a

madera fresca, coco, fruta fresca (con chips de madera de acacia) y gustos lácticos y hongos que aparecieron en el momento del secado de la madera al aire. En las de tostado medio aparecen la vainilla, y los sabores de almendra y pan tostado con sensaciones dulces en boca. Finalmente en la muy tostada aparecen aromas de humo, hollín y alquitrán con sensaciones de acritud.

Hay una mayor estabilización del color en vinos criados con chips con respecto a los conservados en tanques de acero inoxidable en ausencia de chips (Del Álamo et al., 2004). También modifican el potencial redox del vino, tal es así que Del Alamo y otros (2006) estudiaron durante 11 meses la influencia de la crianza en barricas con respecto a la de tanques de acero inoxidable con agregado de chips y de duelas en cantidad tal de lograr una relación superficie expuesta/volumen similar a las barricas y observaron que el potencial redox que se logra con el agregado de chips es similar al de la crianza en barrica, mientras que con la utilización de duelas este aumenta en niveles similares a la barrica pero luego cae rápidamente. Comparando vinos introducidos en barricas de roble americano con otros en tanque con el agregado de diferentes maderas Piracci y otros (2001) encontraron mayor color en los vinos en barricas y más efectiva la acción de las duelas que la de los chips.

Las virutas de roble se agregan en diferentes momentos de la vinificación siendo lo usual colocar las virutas a utilizar en una bolsa y sumergirlas en el vino durante 1 a 2 meses, removiendo de tiempo en tiempo el vino para facilitar la difusión de sus componentes extraíbles.

Factores como el tamaño, la cantidad de madera añadida, el tiempo de contacto con el vino, afectan a las características sensoriales y químicas de los vinos (Del Alamo Sanza, Escudero y De Castro Torio, 2004; Del Alamo Sanza y Nevares Dominguez, 2006; Frangipane, Santis y Ceccarelli, 2007). Por ejemplo, Chira y Teissedre (2013) vieron que con maderas de diferente nivel de tostado los elagitaninos totales, expresados como miligramos de ácido elágico libre por litro de vino, eran muy variables, observándose concentraciones desde 6,31 mg/l hasta 26,1 mg/l. Asimismo, se observó que a menor nivel de tostado la concentración resultante en los vinos era mayor. Esas diferencias eran de esperar por la degradación termolítica que experimentan los elagitaninos durante el proceso de tostado (Doussot et al., 2002; Mosedale et al., 1999). También se observó una mayor extracción durante los tres primeros meses. Esto también lo observó Michel et al. (2011) en vino tinto en contacto con virutas de roble. El máximo de extracción se observó a los 2-3 meses, y después de 9 meses disminuyó. Jourdes (2011) y Jordao (2012) obtuvieron resultados parecidos, observando que intensidades de tostado suave y media de madera de roble muestran mayor actividad antioxidante que las de tostado fuerte. Esto parece indicar que el tostado reduce la actividad antioxidante de la madera de roble.

Otros autores han estudiado el efecto de los chips en la composición fenólica de diferentes vinos (Del Alamo et al., 2004 y 2006, De Coninck et al. 2006 y Gallego et al. 2012), mientras que otros se han centrado en los compuestos volátiles, principalmente en los extraídos de la maderas. Así Guchu et al (2006)

evaluaron la influencia del origen geográfico del roble, el nivel de tostado y el tiempo de contacto en vino blanco. Arapitsas et al. (2004) también estudiaron el tiempo de contacto, pero sólo durante 14 días, y el tamaño de los chips en vino tinto. Frangipane et al (2007) estudiaron cuatro tipos de chips en vino tinto también. Hay una gran variabilidad entre todos estos estudios, probablemente debido a que hay muchos factores que afectan a la cualidades del roble utilizado: origen, especie (Sauvageot et al., 1999), el método utilizado para obtener los chips, y la técnica de secado (natural o artificial) (Masson et al., 2000).

Por ello, para saber los compuestos que el roble cede al vino, el uso de vinos sintéticos tiene la ventaja de asegurar la ausencia de cualquier actividad microbiana. Al mismo tiempo, usando vino sintético, se asegura que no hay compuestos fermentados. Chira y Teissedre en otro estudio (2013), obtuvieron resultados parecidos a los mencionados anteriormente para un vino sintético. En este caso los vinos estuvieron en contacto con chips con diferente nivel de tostado durante 3 meses y las concentraciones obtenidas variaban entre 0,95 y 13,73 mg de ácido elágico libre por litro de vino sintético. También se vio que a mayor nivel de tostado menor es la concentración. Los primeros 2 meses la extracción fue más rápida que durante el último mes.

2.- OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la influencia la incorporación durante tres meses de chips de diferente nivel de tostado sobre la actividad antioxidante, composición fenólica y color de un vino tempranillo.

Para alcanzar este objetivo, los objetivos secundarios serán:

- Evaluar si el nivel de tostado influye en la cinética de cesión y la cantidad de compuestos extraídos desde los chips al vino.
- Evaluar si el proceso de cesión de compuestos fenólicos desde los chips es suficiente o no como para modificar la actividad antioxidante del vino, y si dicha actividad antioxidante se ve influenciada o no por el nivel de tostado de los chips.
- Evaluar si la presencia de chips y su distinto nivel de tostado modifican la evolución natural del color del vino.

3.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo de este trabajo se partió de un vino joven tempranillo que provenía de la bodega Piedemonte (Olite, Navarra).

A este vino se le añadieron dos tipos de chips de roble, uno de tostado suave y otro de tostado fuerte. Asimismo, se preparó un vino sintético al que se le añadieron esos mismos chips en la misma dosis que al vino joven tempranillo. Cada muestra se introdujo en un envase hermético de 3 litros de capacidad, y se almacenó a temperatura constante (12°C) durante 3 meses en una cámara, haciendo muestreos a los 7, 15, 30, 60 y 90 días. Durante este tiempo las muestras se agitaban 2 veces a la semana para facilitar la extracción de los compuestos fenólicos de los chips.

En la tabla 2 se puede ver el diseño experimental del ensayo y lo muestreos que se realizaron.

Tabla 2: Diseño experimental

VINO	CHIPS	REPETICIÓN	NOMBRE	D7	D15	D30	D60	D90
Tempranillo	Sin	1	V01		X	X	X	X
		2	V02		X	X	X	X
	Suave	1	VS1		X	X	X	X
		2	VS2		X	X	X	X
	Fuerte	1	VF1		X	X	X	X
		2	VF2		X	X	X	X
Sintético	Suave	1	SS1	X	X	X	X	X
		2	SS2	X	X	X	X	X
	Fuerte	1	SF1	X	X	X	X	X
		2	SF2	X	X	X	X	X

En todos los muestreos realizados se analizaron la actividad antioxidante (FRAP, DPPH) y la concentración de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu). En cuanto al análisis de los compuestos fenólicos mediante HPLC, los antocianos sólo se midieron para los vinos tempranillo y los elagitaninos para las muestras que contenían chips. El color se midió mediante el método tradicional y el método Cielab para los vinos tempranillo.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ESTUDIO

En la Tabla 3 se pueden ver las características del vino utilizado para las muestras de vino joven tempranillo:

Tabla 3: Características vino del ensayo

Acidez volátil (g ácido acético/l)	0,43
SO ₂ libre (m/l)	22,4
Grado alcohólico (%v/v)	12,5
pH	3,54
Acidez total (g ácido tartárico/l)	5,0

El vino sintético se preparó con agua desionizada, etanol de grado HPLC 12% (v/v) y ácido tartárico 4,5 g/l. Posteriormente se introdujo en unos envases herméticamente cerrados y que contenían un mecanismo para extraer las muestras durante el ensayo (Figuras 15). De igual modo, el vino joven tempranillo también se introdujo en el mismo tipo de envases herméticos (Figura 16).

Los chips procedían de la Tonelería Intona (Industrial Tonelera Navarra), Monteagudo (Navarra); y eran de roble americano, unos con tostado suave-medio (TS) y los otros con tostado alto (TF). A ambos vinos, Tempranillo y sintético, se les añadió una dosis de chips de 5 g/l, cada depósito contenía 15 g de chips que se introdujeron en bolsas tipo malla de uso alimentario.



Figura 15: Muestras de vino sintético D+0



Figura 16: Muestras de vino joven tempranillo D+0

4.2. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

4.2.1. Método DPPH

El método utilizado se basa en el que propusieron Bobo et al. (2014). Las muestras fueron diluidas 50 veces (excepto para los vinos sintéticos, que se diluyeron a 1:2 durante el primer mes, y a 1:4 en los dos últimos muestreos). Para la realización del análisis, se añadieron 20 μ l de muestra diluida a 180 μ l de solución DPPH (150 μ M, en el 80% de metanol (v/v)) y fueron agitadas durante un minuto en una microplaca 96F Well (NUNC, Roskilde, Dinamarca). Tras 40 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 515 nm en el lector de microplacas de un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan ir (ThermoFisher Scientific, Vartaa, Finlandia).

El % de inhibición del DPPH fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = (1 - (\text{Abs}_{\text{mue}} - \text{Abs}_{\text{BM}} - \text{Abs}_{\text{B}} / \text{Abs}_{\text{BR}} - \text{Abs}_{\text{B}})) * 100$$

Abs_{mue} = Absorbancia de la muestra (o el patrón) a 515nm tras 40 min en oscuridad

Abs_{BR} = Absorbancia del blanco reactivo (20 µl de agua destilada, 180 µl de reactivo DPPH (150 µM en metanol al 80%) a 515nm tras 40 min en oscuridad.

Abs_{BM} = Absorbancia del blanco de muestra (20 µl de muestra y 180 µl de metanol 80%) a 515nm tras 40 min en oscuridad.

Abs_B = Absorbancia del blanco (20 µl de agua destilada y 180 µl de metanol 80%) a 515 nm tras 40 min en oscuridad.

Para obtener los resultados finales se utilizó una recta de calibración (Figura 17) que relaciona la absorbancia obtenida y la concentración de Trolox (50 - 500 µM Trolox), expresándose los resultados finales en mM Trolox/g de materia seca. De cada muestra se realizaron tres diluciones que fueron medidas por separado y de cada dilución se realizaron cinco lecturas. Por lo tanto, de cada muestra se realizaron 15 lecturas.

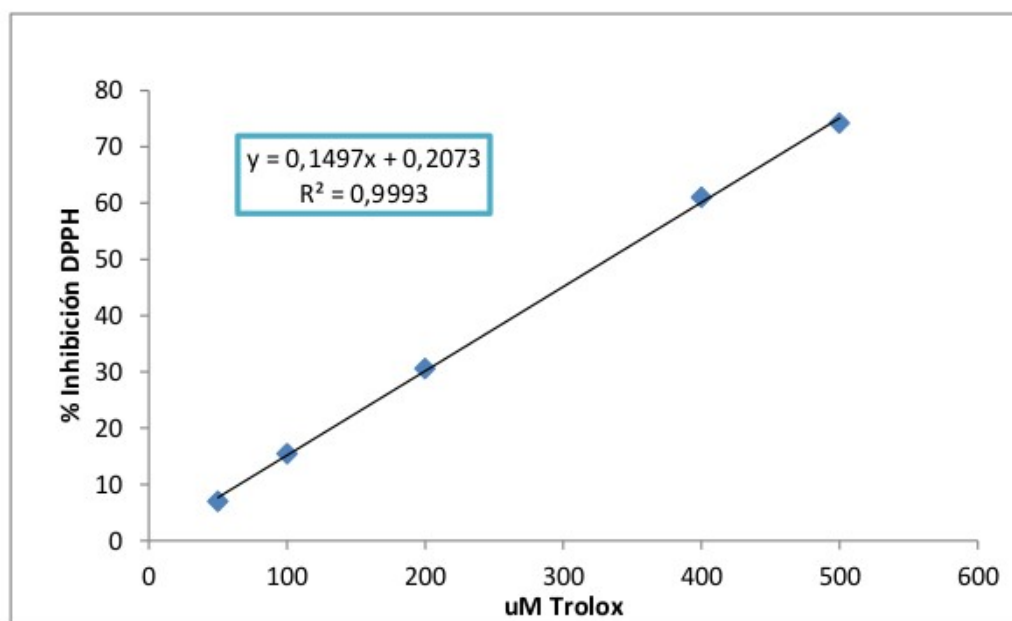


Figura 17: Recta patrón para el método DPPH.

4.2.2. Método FRAP

El método que se siguió está basado en el método propuesto por Benzie et al (1996) con algunas modificaciones. Las muestras fueron diluidas 50 veces (excepto para los vinos sintéticos, que se diluyeron a 1:2 durante el primer mes, y a 1:4 en los dos últimos muestreos). Para la realización del análisis, se mezclaron 10 µl de muestra, 30 µl de agua y 300 µl de reactivo FRAP (10 volúmenes de acetato de sodio (300mM), 1 volumen de una solución de TPTZ en HCl (10 mM) y 1 volumen de cloruro de hierro hexahidratado (20 mM) en pocillos de una placa 96F Well (NUNC, Roskilde, Dinamarca) y se midió la absorbancia a 593 nm a los cuatro minutos. A partir de la siguiente ecuación, se calculó la diferencia entre la absorbancia de la muestra y la de los blancos (Δabs):

$$\Delta\text{abs} = \text{Abs}_{\text{mue}} - \text{Abs}_{\text{BL}} - \text{Abs}_{\text{BR}}$$

Abs_{mue} = Absorbancia de la muestra medida por el espectrofotómetro a los cuatro minutos.

Abs_{BL} = Absorbancia del blanco (340 µl de agua destilada)

Abs_{BR} = Absorbancia del blanco reactivo (300 µl de reactivo FRAP, 30 µl de agua destilada y 10 µl de etanol/agua 50%).

Finalmente, se utilizó una de recta de calibración (Figura 18) que relaciona esta diferencia de absorbancia con la concentración de Trolox (50 - 500 µM Trolox), expresándose los resultados en mM Trolox/g de materia seca. De cada muestra se realizaron tres diluciones que fueron medidas por separado y de cada dilución se realizaron ocho lecturas. Por lo tanto, de cada extracción se realizaron 24 lecturas.

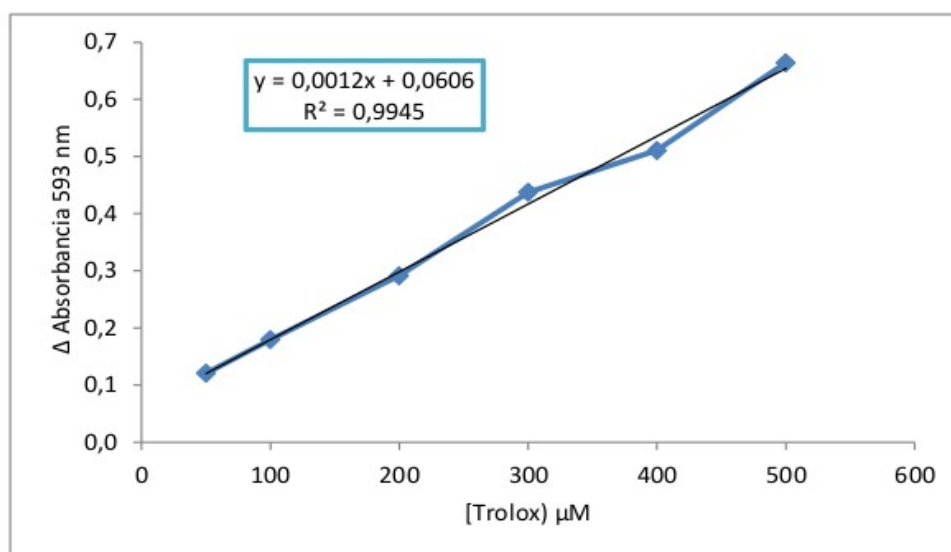


Figura 18: Recta patrón para el método FRAP.

4.2.3. Método Folin – Ciocalteu

El método que se siguió está basado en el método propuesto por Bobo et al (2014). Antes de la realización del análisis, las muestras fueron diluidas 50 veces. Para la realización del análisis, 20 µl del extracto diluido se mezclaron con 100 µl de reactivo Folin-Ciocalteu (diluido 1:4) y se agitó durante 1 minuto en una placa 96F Well (NUNC, Roskilde, Dinamarca). La mezcla reposó durante 4 minutos y, posteriormente, se añadieron 75 µl de solución de carbonato de sodio (10% p/v) y se agitó la mezcla a velocidad media durante un minuto. Después de dos horas a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 750 nm mediante el lector de microplacas Thermo Scientific de un espectrofotómetro Multiskan GO (ThermoFisher Scientific, Vartaa, Finlandia). A partir de la siguiente ecuación, se calculó la diferencia entre la absorbancia de la muestra y la de los blancos (Δabs):

$$\Delta\text{abs} = \text{Abs}_{\text{mue}} - \text{Abs}_{\text{BL}} - \text{Abs}_{\text{BR}} - \text{Abs}_{\text{BM}}$$

Abs_{mue} = Absorbancia de la muestra medida por el espectrofotómetro a las dos horas.

Abs_{BL} = Absorbancia del blanco (195 µl de agua destilada)

Abs_{BR} = Absorbancia del blanco reactivo (20µl agua destilada, 100µl reactivo Folin-Ciocalteu (1:4) y 75µl Carbonato sódico (10%))

Abs_{BM} = Absorbancia del blanco de muestra (20µl muestra y 175µl agua destilada)

Finalmente, se utilizó una de recta de calibración (Figura 19) que relaciona esta diferencia de absorbancia obtenida y la concentración de ácido gálico (10 - 200 mg ácido gálico/litro), expresándose los resultados en mg ácido gálico/g de materia seca. De cada muestra se realizaron tres diluciones que fueron medidas por separado y de cada dilución se realizaron cinco lecturas. Por lo tanto, de cada muestra se realizaron 15 lecturas.

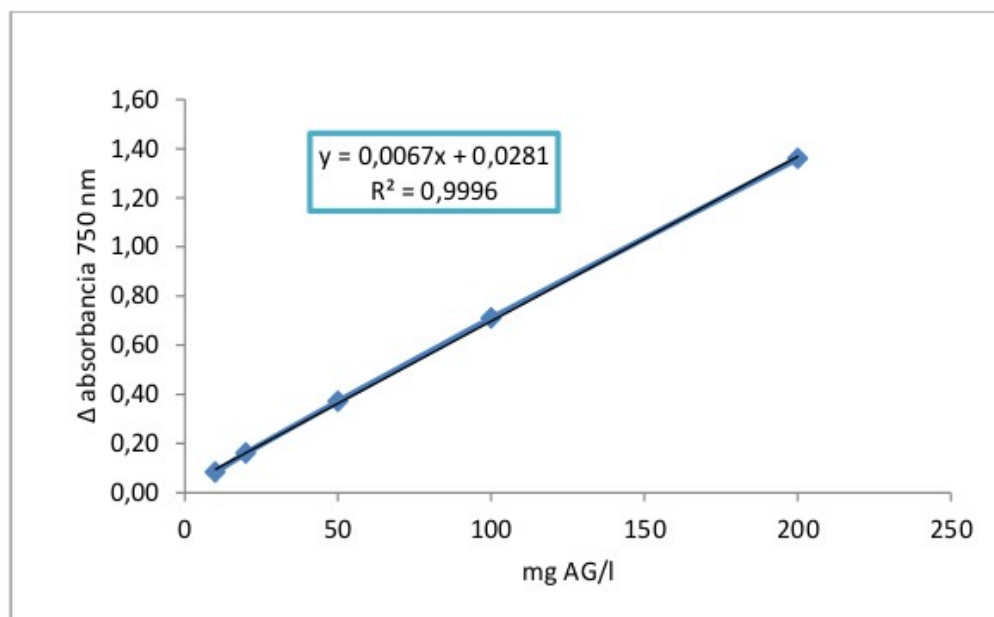


Figura 19: Recta patrón para el método Folin - Ciocalteu

4.3. IDENTIFICACIÓN DE COMUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE HPLC

4.3.1. Antocianos

Para la identificación de los antocianos se siguió la metodología propuesta por Gonzalez del Pozo (2010). Para ello se utilizó el cromatógrafo de líquidos Waters 2695 equipado con un detector de diodo Waters 996 y se midió la absorbancia a 520 nm. La separación de los compuestos se realizó en una columna Waters Nova Pak C18, 150 x 2mm, 4 μ m. Las fases móviles utilizadas fueron agua:acetonitrilo (95:5) (A) y agua:acetonitrilo (40:60) (B), ambas ajustadas a pH 1,3 con ácido perclórico. El gradiente utilizado fue 15 a 25% de B durante 20 min, de 25 a 35% de B durante 10 min, de 35 a 36% de B durante 5 min y de 36 a 40% de B durante 12 min. El flujo durante las inyecciones fue de 0,2 ml/min.

Para cada determinación se inyectaron 20 μ l de muestra de vino previamente filtrada con filtros de PVDF con poros de 0,45 μ m.

Los compuestos identificados fueron los monoglucósidos de delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina, malvidina; los acetatos de los monoglucosidos de peonidina y malvidina, y los p-cumaratos de petunidina, peonidina y malvidina. La identificación se realizó en base al orden de elución de los compuestos, y a su espectro de absorción entre 250 y 600 nm.

Todos los picos se cuantificaron a través de una recta de calibración (Figura 20) realizada con un patrón comercial de monoglucósido de malvidinan (Extrasynthese, Francia). Las rectas están elaboradas a partir del valor medio de tres determinaciones para cada concentración. De cada muestra se realizaron dos medidas.

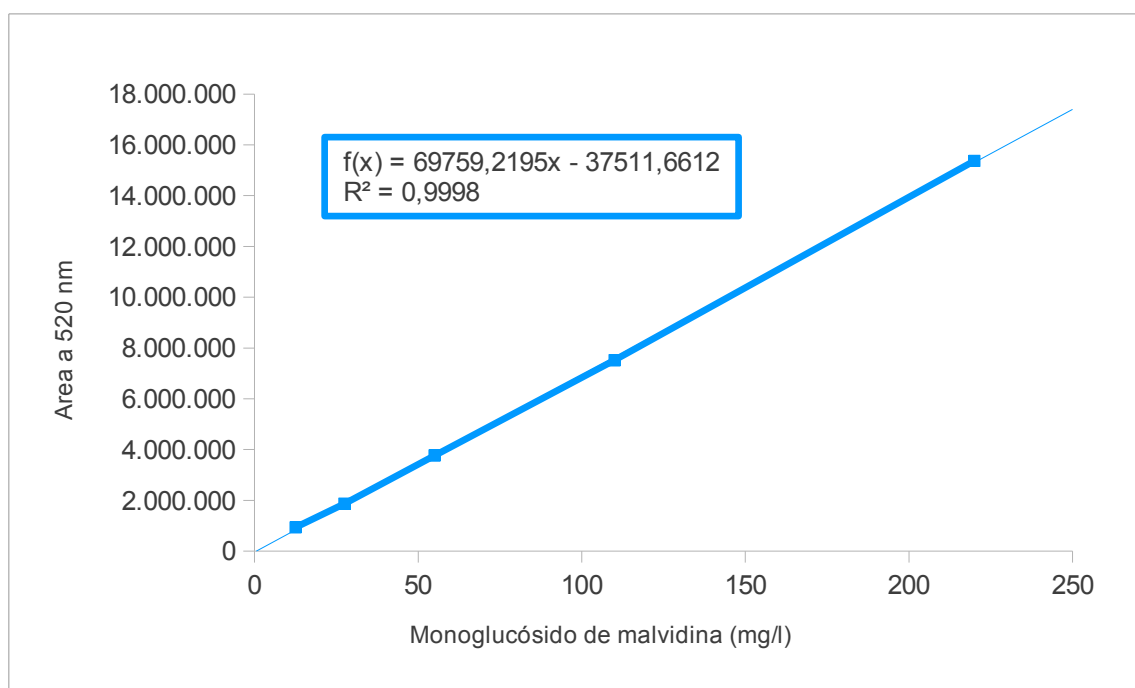


Figura 20: Recta patrón para antocianos

4.3.2. Elagitaninos

La concentración de los elagitaninos extraídos de los chips en los vinos de tempranillo y en los vinos sintéticos se determinó a través de la cuantificación mediante HPLC del contenido en ácido elágico de las muestras antes y después de su hidrólisis ácida. El valor obtenido antes de la hidrólisis se corresponde con el contenido en ácido elágico libre. Este valor se sustrajo al obtenido tras la hidrólisis para obtener una estimación del contenido en elagitaninos.

La hidrólisis se realizó de acuerdo al método utilizado por Chira y Teissedre (2013), basado a su vez en el de Peng et al. (1991). Para ello se evaporan 20 ml de muestra a 80°C en vacío y el residuo resultante se disuelve en metanol con HCl 2N hasta 10 ml. Se toman 4 ml de esta mezcla y se introducen en tubos de vidrio, que se cierran, y se mantienen en un baño de agua a 100°C durante 2,5 h. Se comprobó que en

estas condiciones el volumen contenido en los tubos no disminuyó. Además, tras realizar 5 repeticiones de la hidrólisis sobre una misma muestra y determinar su contenido en ácido elágico, se comprobó que la repetitividad del método (hidrólisis + análisis cromatográfico) era muy elevada, con un coeficiente de variación menor al 5%. Para el procesamiento de las muestras se realizó una hidrólisis y se repitió dos veces la determinación cromatográfica.

Para la cuantificación del ácido elágico mediante HPLC se siguió la metodología propuesta por Chira y Teissedre (2013). Para ello se utilizó el cromatógrafo de líquidos Waters 2695 equipado con un detector de diodo Waters 996 y se midió la absorbancia a 254 nm. La separación de los compuestos se realizó en una columna LiCrospher RP-18e, 250x4, 5 µm. Las fases móviles utilizadas fueron agua:fosfórico (99,9:1) (A) y metanol:fosfórico (99,9:1) (B). El gradiente utilizado fue 0 a 35% de B durante 5 min, 45% de B durante 25 min y 100% de B durante 5 min. El flujo durante las inyecciones fue de 1 ml/min.

Para cada determinación se inyectaron 20 µl de muestra de vino previamente filtrada con filtros de PVDF con poros de 0,45 µm.

Se realizó una recta de calibración (Figura 21) para el ácido elágico que relacionaba el área a 254 nm con la concentración de ácido elágico. Las rectas están elaboradas a partir del valor medio de tres determinaciones (inyecciones) para cada concentración.

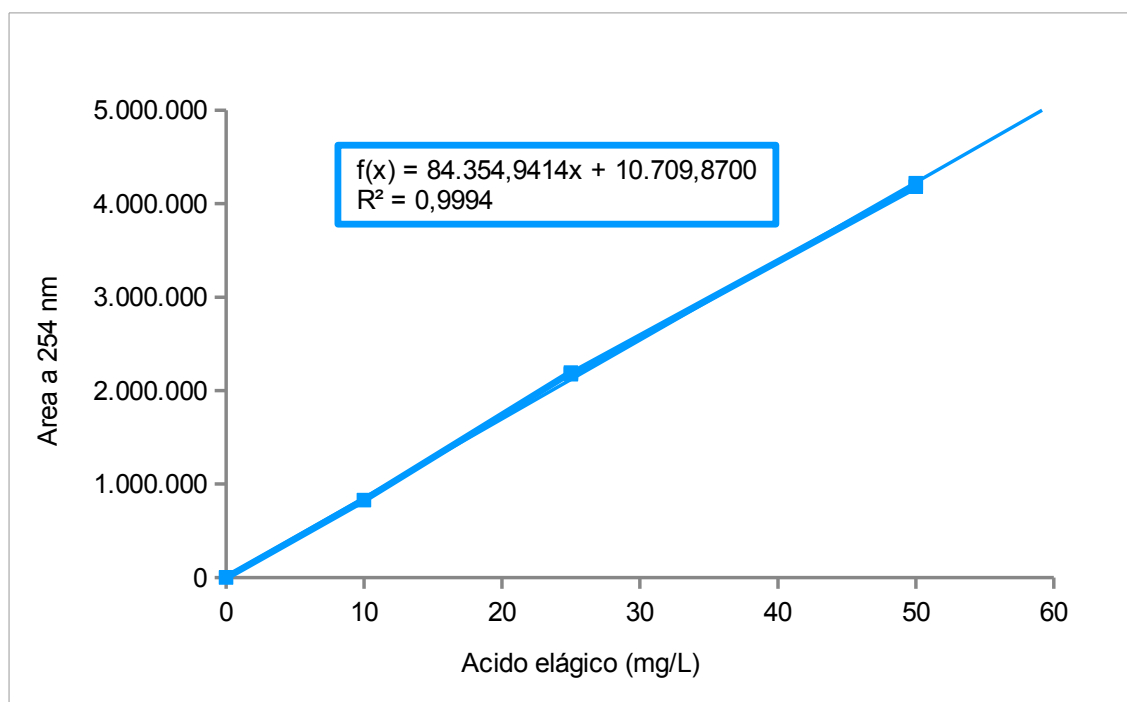


Figura 21: Recta patrón para elagitaninos

4.4. ANÁLISIS DEL COLOR

4.4.1. Método estándar (CEE/Reglamento 2679/90. Método de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. Diario oficial de las comunidades Europeas)

Para la medida de color mediante el método estándar se ha utilizado un espectrofotómetro Multiskan GO (ThermoFisher Scientific, Vartaa, Finlandia) mediante medidas directas de la absorbancia de los vinos a longitudes de onda de 420, 520 y 620 nm. Las lecturas se realizaron en cubetas de vidrio óptico de 1 mm de paso. A partir de ellas y tras multiplicar las lecturas por 10 para obtener la absorbancia correspondiente a 1 cm de paso, se obtuvieron los siguientes parámetros relacionados:

Intensidad colorante (IC): se obtiene a partir de la suma de la absorbancia de las tres longitudes de onda:

$$IC = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

Tonalidad (T): cociente entre la absorbancia relativa a color amarillo y la relacionada con el color rojo:

$$\text{Tonalidad (T)} = (A_{420}/A_{520}) \times 100$$

4.4.2. Método CIELAB

Para la medida de color mediante el método CIELAB se ha utilizado un espectrofotómetro Multiskan GO (ThermoFisher Scientific, Vartaa, Finlandia) mediante medidas directas de la absorbancia de los vinos a longitudes de onda de 450, 520, 570, 620 y 630 nm. Las lecturas se realizaron en cubetas de vidrio óptico de 1 mm de paso. A partir de ellas, mediante el programa MSCV desarrollado por el Grupo de Color de la Universidad de La Rioja (<http://www.unirioja.es/color/descargas.shtml>) se obtuvieron las coordenadas del espacio CIELAB: L, a y b.

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó con el programa STATGRAPHICS Centurion XVII (Statpoint Technologies, Inc. Warrenton, Virginia, EEUU), para ello se hicieron análisis de ANOVA de dos factores (chips, tiempo) de los resultados relativos a la actividad antioxidante, contenido en fenoles totales y contenido de cada compuesto fenólico individual.

5.- RESULTADOS

Este apartado se estructura en varios puntos. En primer lugar se presentan los resultados obtenidos para los vinos sintéticos; en concreto, se analizan los datos del contenido de elagitaninos y su cinética de extracción; después la actividad antioxidante (mediante los métodos DPPH y FRAP) que éstos aportan y el contenido de polifenoles (mediante el método FOLIN). Posteriormente, se estudian estos mismos parámetros para los vinos de tempranillo, comparándose con los obtenidos para los vinos sintéticos. Por último, se estudia el contenido de antocianos y su efecto sobre el color.

5.1. VINO SINTÉTICO

Para saber los compuestos que la madera de roble cede al vino, el uso de un vino sintético tiene la ventaja de asegurar la ausencia de cualquier actividad microbológica. Al mismo tiempo, se asegura que no hay compuestos fermentados. Hay muy pocos estudios en la bibliografía que hayan estudiado la caracterización de la madera de roble en un medio sintético (Rodríguez y Gómez, 2011; Chira y Teissedre, 2013).

Por eso, para clarificar el impacto que la madera de roble puede tener en la composición del vino de este estudio, se utilizó un vino sintético. Esta simulación minimiza cualquier efecto que pudiera surgir debido a los compuestos naturalmente presentes en el vino, y además la actividad microbiana es mínima o casi inexistente.

La concentración de elagitaninos en vinos se midió mediante HPLC. El contenido total de elagitaninos se evaluó mediante la cuantificación del ácido elágico liberado a través de una hidrólisis ácida de los elagitaninos, substrayendo después la cantidad de ácido elágico libre presente inicialmente en la muestra. En la Figura 22 se pueden ver los cromatogramas obtenidos para el vino sintético con chips de tostado suave antes y después de la hidrólisis. El contenido total de elagitaninos durante el ensayo osciló desde valores de 0,68 a 8,68 mg /l de ácido elágico liberado en el vino sintético (Figura 23). Estos valores están en el mismo rango que los hallados por Chira y Teissedre en 2013 para vinos sintéticos en contacto con chips de diferente nivel de tostado, que fueron de entre 0,95 y 13,72 mg/l.

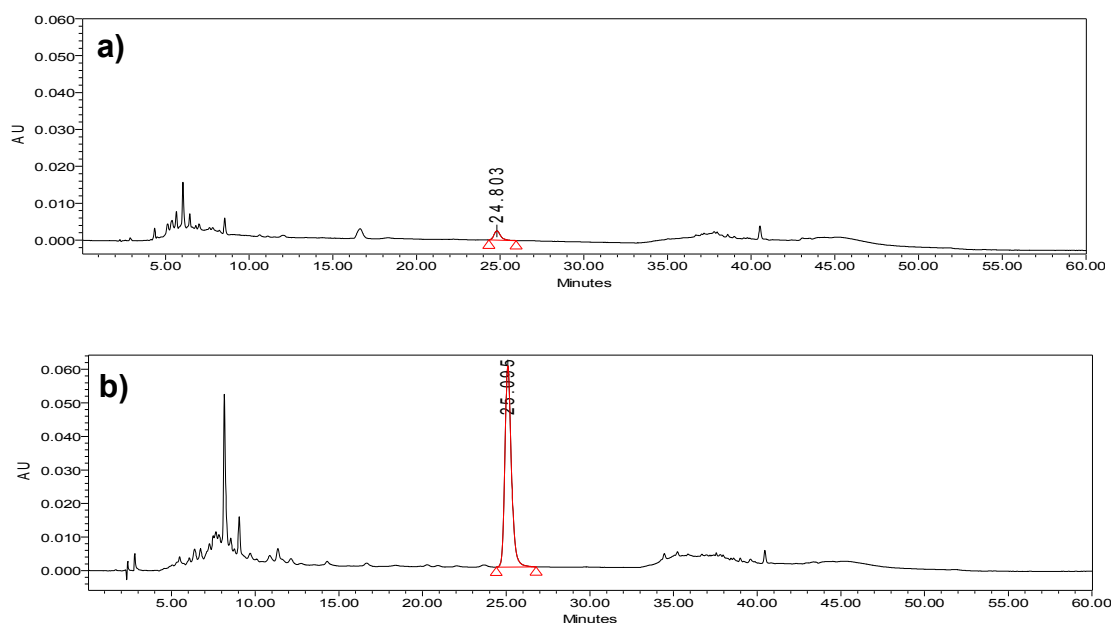


Figura 22. Cromatograma de elagitaninos obtenido para el vino sintético con chips de TS (t: 90 días). (a: antes de hidrólisis; b: después de hidrólisis) (*)Nota: El pico integrado se corresponde con el ácido elágico.

En la Tabla 4 se muestra la influencia de las dos variables analizadas (tiempo y chips) en los resultados del contenido de ácido elágico libre y elagitaninos; así como una posible interacción entre las dos variables mediante el valor de p en los vinos sintéticos. Asimismo se han incluido las medias y la desviación estándar de cada parámetro según el tiempo y los chips.

Tabla 4: Resultados del ANOVA (tiempo, chips) de los elagitaninos en los vinos sintéticos.

	Acido elagico (mg ácido elágico/l)	Elagitaninos (mg ácido elágico/l)
p_{tiempo}	0,0000	0,0000
7 días	0,35 ± 0,02 a	2,19 ± 0,22 a
15 días	0,38 ± 0,02 a	3,69 ± 0,22 b
30 días	0,55 ± 0,02 ab	4,19 ± 0,22 bc
60 días	0,33 ± 0,02 c	4,76 ± 0,22 cd
90 días	0,41 ± 0,02 d	5,01 ± 0,22 d
p_{chips}	0,0000	0,0000
TF	0,27 ± 0,01 a	1,52 ± 0,14 a
TS	0,54 ± 0,01 b	6,41 ± 0,14 b
$p_{\text{interacción}}$	0,0053	0,0000

Se presentan el valor p y las medias ± desviación típica. Dos valores seguidos de letras distintas indican la existencia de diferencias significativas al 95% de confianza.

TF: tostado fuerte, TS: tostado suave.

Como se observa en la Tabla 4, hubo importantes diferencias entre las medias de los elagitaninos de tostado suave (TS) y los de tostado fuerte (TF) durante todo el ensayo. Por ejemplo, al final del ensayo, el vino sintético con chips de tostado suave dio de media 8,01 mg/l, mientras que la media de tostado fuerte fue de 2,01 mg/l (Figura 23). Estas diferencias eran de esperar ya que los elagitaninos experimentan degradaciones termolíticas durante el proceso de tostado de los chips. Chira y Teissedre (2013) también observaron estas diferencias en vinos sintéticos y en vinos de la variedad Merlot. Además, este hecho ha sido observado también en vinos de diferentes variedades por otros autores, Doussot et al. (2002) y Mosedale et al. (1999).

Asimismo, si examinamos la Figura 23, parece que la extracción de los elagitaninos fue más rápida durante el primer mes, estabilizándose este incremento durante los meses siguientes. Esto puede ser debido a que al principio se extrajeron los elagitaninos de las primeras capas de los chips, que estaban más accesibles, pero conforme avanza el tiempo hay que acceder a capas más profundas y más difíciles de extraer, esto hace que la extracción fuera más lenta después del primer mes (Chira, 2013).

Además, esta tendencia exponencial de extracción de elagitaninos es mucho más pronunciada en los vinos sintéticos con chips de tostado suave que en los de tostado fuerte, eso quiere decir que los elagitaninos se extraen más rápidamente en el vino con chips de tostado suave. Por lo tanto, a mayor tostado no sólo la concentración de elagitaninos es menor, sino que también la cinética de extracción es más lenta.

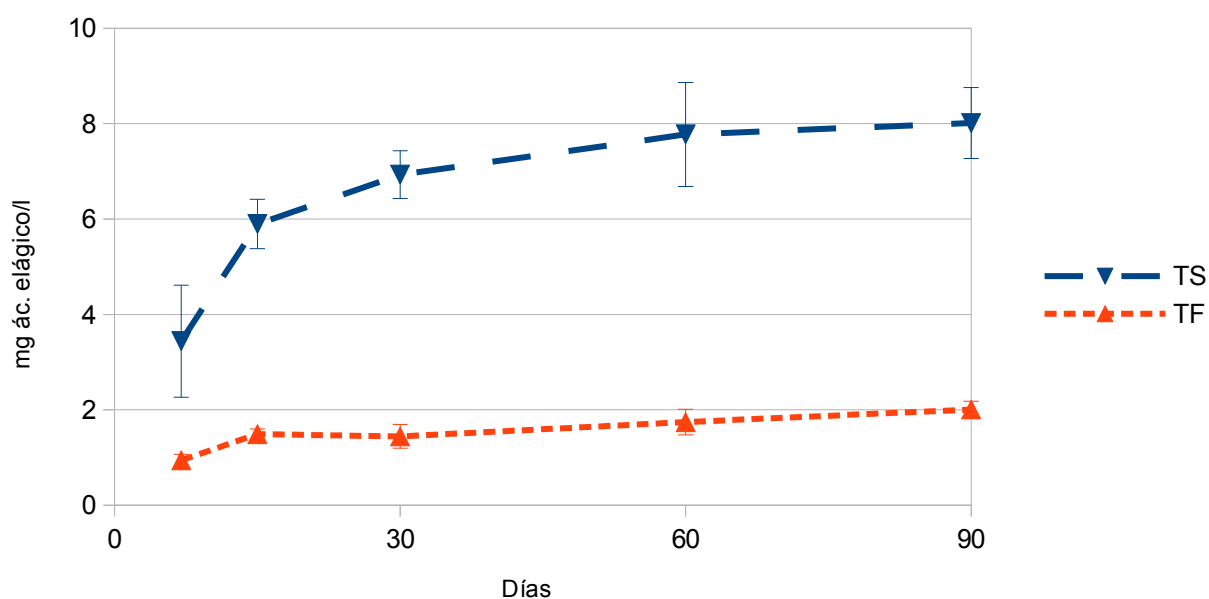


Figura 23: Resultados obtenidos para la estimación de elagitaninos mediante HPLC en vinos sintéticos.

Por otro lado, atendiendo a la Figura 24, podemos ver el ácido elágico libre presente en el vino, parece que también aumentó durante el primer mes y que luego tiende a estabilizarse, como es lógico estos resultados coinciden con los de los elagitaninos observados en la Figura 23 y se deben a que los elagitaninos presentes en las primeras capas de los chips son más accesibles.

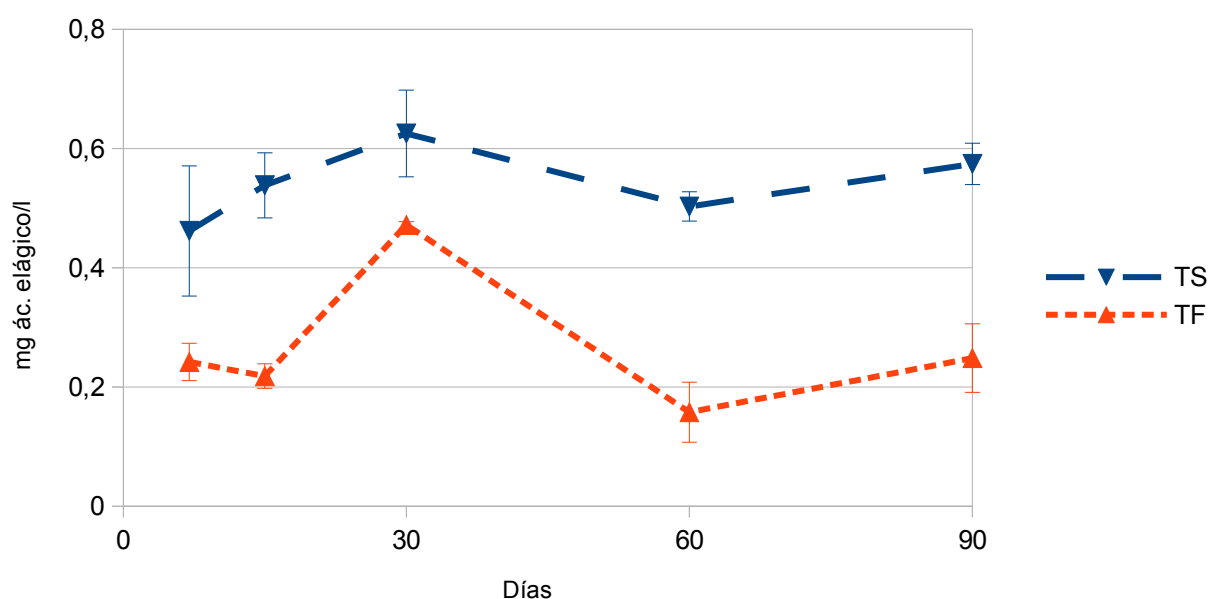


Figura 24: Resultados obtenidos para el ácido elágico libre mediante HPLC en vinos sintéticos.

A continuación estudiaremos los resultados obtenidos para el contenido de polifenoles, la actividad antioxidante que aportan y su relación con los elagitaninos. En la Tabla 5 se muestra la influencia de las dos variables analizadas (tiempo y chips) en los resultados de los dos métodos de medida de la actividad antioxidante (FRAP y DPPH), de la concentración de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu) así como una posible interacción entre las dos variables.

Se observa que ambas variables son significativas y que la interacción entre ambas también lo es, por lo tanto, hay diferencias significativas en el tiempo y según el tipo de tostado de los chips. Además todos los parámetros aumentan con el tiempo y, en este caso también, los resultados del tostado suave parecen ser mayores que los del tostado fuerte. Esto puede ser debido a que el tostado de la madera de roble tiene una influencia considerable en la composición polifenólica de la misma, ya que las características químicas están fuertemente relacionadas con la intensidad del tostado (Chira, 2013). Gran parte de las moléculas que son cedidas al vino por la madera del roble se producen o degradan durante el proceso de tostado.

Tabla 5. Resultados del ANOVA (tiempo, chips) en las variables polifenoles totales y de capacidad antioxidante en los vinos sintéticos.

	Polifenoles totales (mg/l)	CA – FRAP (μ M Trolox)	CA – DPPH (μ M Trolox)
p_{tiempo}	0,0000	0,0000	0,0000
7 días	39 \pm 2 a	252 \pm 21 a	402 \pm 18 a
15 días	53 \pm 2 b	352 \pm 21 b	436 \pm 18 a
30 días	65 \pm 1 c	444 \pm 17 c	501 \pm 18 b
60 días	77 \pm 1 d	452 \pm 12 d	728 \pm 13 c
90 días	85 \pm 1 e	632 \pm 12 e	762 \pm 12 c
p_{chips}	0,0000	0,0000	0,0000
TF	44 \pm 1 a	279 \pm 11 a	344 \pm 12 a
TS	83 \pm 1 b	574 \pm 10 b	788 \pm 8 b
$p_{\text{interacción}}$	0,0000	0,0000	0,0000

Se presentan el valor p y las medias \pm desviación típica. Dos valores seguidos de letras distintas indican la existencia de diferencias significativas al 95% de confianza.

TF: tostado fuerte, FS: tostado suave.

En la Figura 25 se observa que el contenido en polifenoles totales aumenta con el tiempo en el caso de los vinos sintéticos, y este aumento es mayor para los chips de tostado suave. En este caso, se ve claramente que durante el envejecimiento con chips se van liberando compuestos polifenólicos, mayormente elagitaninos, que van aumentando progresivamente. Durante los primeros 60 días aumentan más rápidamente para el vino con chips de tostado suave disminuyéndose después la velocidad de extracción; y en el caso del vino con chips de tostado fuerte el aumento parece constante y continuo a lo largo del periodo de tiempo estudiado. Esto se debe a que al principio se liberan más rápidamente porque la madera lleva poco tiempo en contacto con el vino sintético, pero a los 3 meses ya se han liberado la mayoría de compuestos, o comienza a saturarse el medio de extracción. Como era de esperar, estos resultados coinciden con las curvas exponenciales obtenidas para el contenido de elagitaninos (Figura 23), ya que éstos son los únicos polifenoles que hay en el vino sintético.

Como ya se ha comentado, en el caso de los chips de tostado suave esta liberación es mayor, esto puede estar relacionado con el proceso de tostado, en el que se han podido dar reacciones de degradación y es por ello que no se liberen tantos compuestos. Otro motivo que podría ser es que los compuestos hayan reaccionado entre ellos y que estén retenidos en la madera por enlaces más difíciles de romper y que sea ese el motivo por el que los compuestos polifenólicos se liberen más lentamente (Chira, 2013).

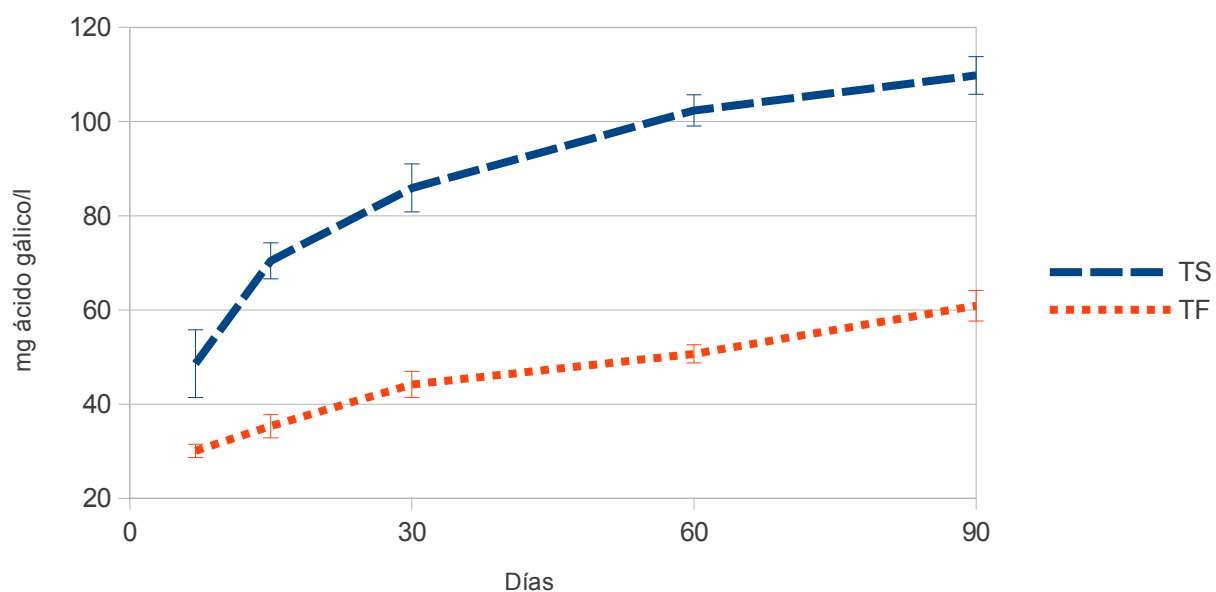


Figura 25. Resultados obtenidos para polifenoles totales mediante el método FOLIN en los vinos sintéticos

La actividad antioxidante aumentó con el tiempo, tanto la medida por el método FRAP (Figura 26) como la medida por el método DPPH (Figura 27), y además es más pronunciada para los chips de tostado suave. Esto es debido a la actividad antioxidante que han aportado los chips de roble, por eso, al igual que los elagitaninos va aumentando a lo largo del tiempo y parece que los chips de tostado suave aportan mayor actividad antioxidante.

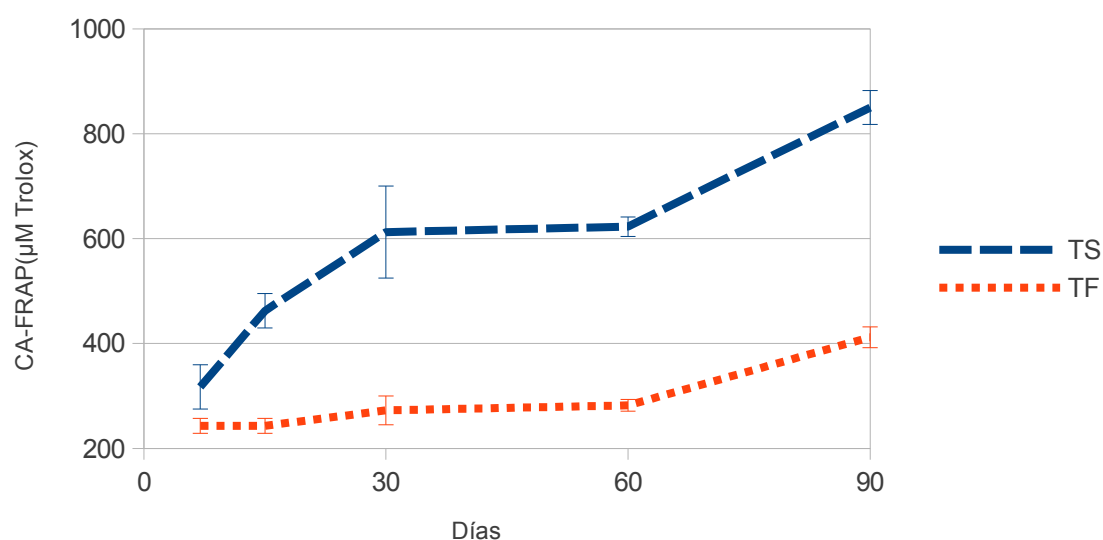


Figura 26. Resultados obtenidos para la capacidad antioxidante mediante el método FRAP en los vinos sintéticos.

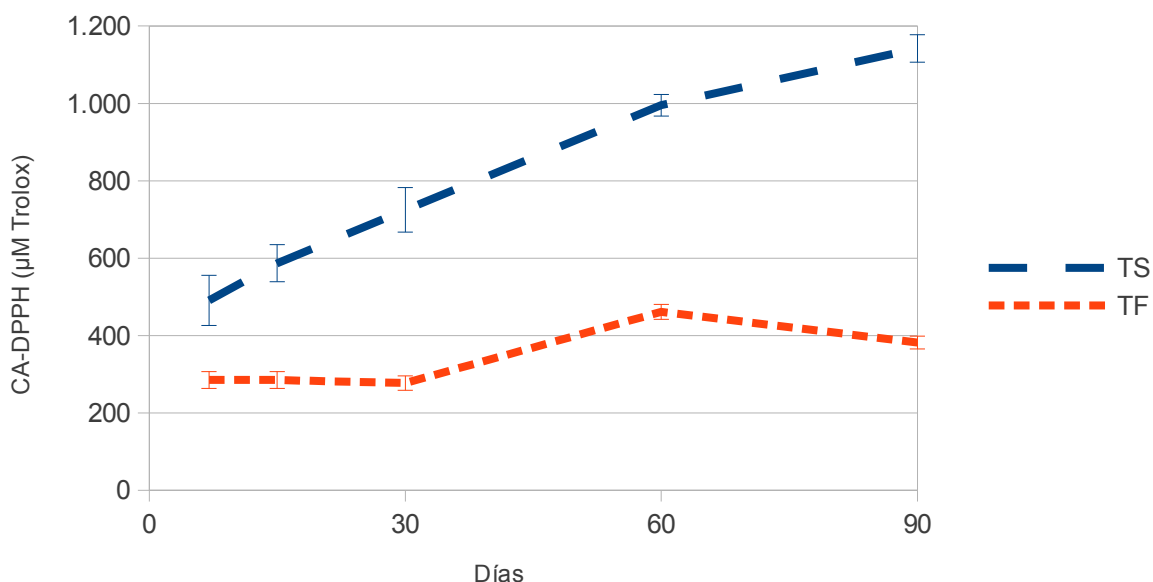


Figura 27. Resultados obtenidos para la capacidad antioxidante mediante el método DPPH en los vinos sintéticos.

5.2. VINO TEMPRANILLO

En la Tabla 6 se muestra la influencia de las dos variables analizadas (tiempo y chips) para el contenido de ácido elágico libre previo a la hidrólisis y la estimación de elagitaninos obtenida después de la hidrólisis, así como una posible interacción entre las dos variables.

Como se puede observar todas las variables son significativas, es decir, tanto el tiempo como el tostado de los chips afectan en ambos parámetros. Hay diferencias significativas a lo largo del tiempo según el tipo de chips. Los resultados obtenidos durante el ensayo para la concentración de elagitaninos oscilaron entre 2,42 y 8,12 mg/l (Figura 28), estos datos coinciden con los observados por Chira y Teissedre en 2013 que fluctuaron entre 6,31 y 26,1 mg/l para vinos con chips de diferente tostado.

Tabla 6: Resultados del ANOVA (tiempo, chips) de los elagitaninos en los vinos tempranillo.

	Acido elagico (mg ácido elágico/l)	Elagitaninos (mg ácido elágico/l)
<i>p</i> _{tiempo}	0,0000	0,0000
15 días	1,55 ± 0,03 a	3,90 ± 0,13 a
30 días	1,82 ± 0,03 b	4,86 ± 0,13 b
60 días	1,47 ± 0,03 a	6,33 ± 0,13 c
90 días	1,78 ± 0,03 b	6,38 ± 0,13 c
<i>p</i> _{chips}	0,0000	0,0000
TF	1,43 ± 0,02 a	4,22 ± 0,09 a
TS	1,88 ± 0,02 b	6,52 ± 0,09 b
<i>p</i> _{interacción}	0,0048	0,0000

Se presentan el valor p y las medias ± desviación típica. Dos valores seguidos de letras distintas indican la existencia de diferencias significativas al 95% de confianza.

TF: tostado fuerte, FS: tostado suave..

En el caso del vino con chips de tostado suave parece que la extracción de elagitaninos alcanza el máximo a los 2 meses con una media de 8,1 mg/l y a los 3 meses en el caso del vino con chips de tostado fuerte con una media de 5,3 mg/l (Figura 28). Estos resultados coinciden con los observados por Michel et al. (2011) en duelas y Chira y Teissedre (2013) en chips, en ambos estudios se vio que los vinos alcanzaron el pico máximo de extracción de elagitaninos después de 2 o 3 meses.

La disminución de la extracción de elagitaninos al final del periodo de almacenamiento puede ser atribuida a la alta reactividad de estos compuestos con otros constituyentes del vino (Jordao et al., 2008; Quideau et al., 2005). En los primeros dos meses, el vino extrae los elagitaninos más rápidamente que las reacciones de condensación que se dan entre los elagitaninos y otros constituyentes del vino como son las catequinas, epicatequinas, etanol y otros. Después, cuando casi todos los elagitaninos de las primeras capas de los chips ya han sido extraídos, el vino necesita acceder a capas más profundas de los chips y que son más difíciles de extraer, esto hace que la extracción sea más lenta.

Si comparamos la cinética de extracción de elagitaninos con los obtenidos para los vinos sintéticos vemos que estos últimos seguían una curva exponencial (Figura 23), mientras que en la Figura 28 si que parece que los elagitaninos aumentan con el tiempo pero la curva exponencial no es tan clara. Además en este caso el máximo de extracción se da a los dos meses en lugar del primer mes para los vinos con chips de tostado suave, y en el tercer mes para los chips de tostado fuerte. Esto es debido a que en el caso del vino tempranillo hay otros muchos compuestos reaccionando con los elagitaninos y formando nuevos compuestos más complejos que pueden hacer variar los resultados, en los vinos sintéticos no había esta distorsión.

Otro aspecto a mencionar es que en este caso la diferencia entre el tostado suave y el tostado fuerte no es tan grande como era en los vinos sintéticos.

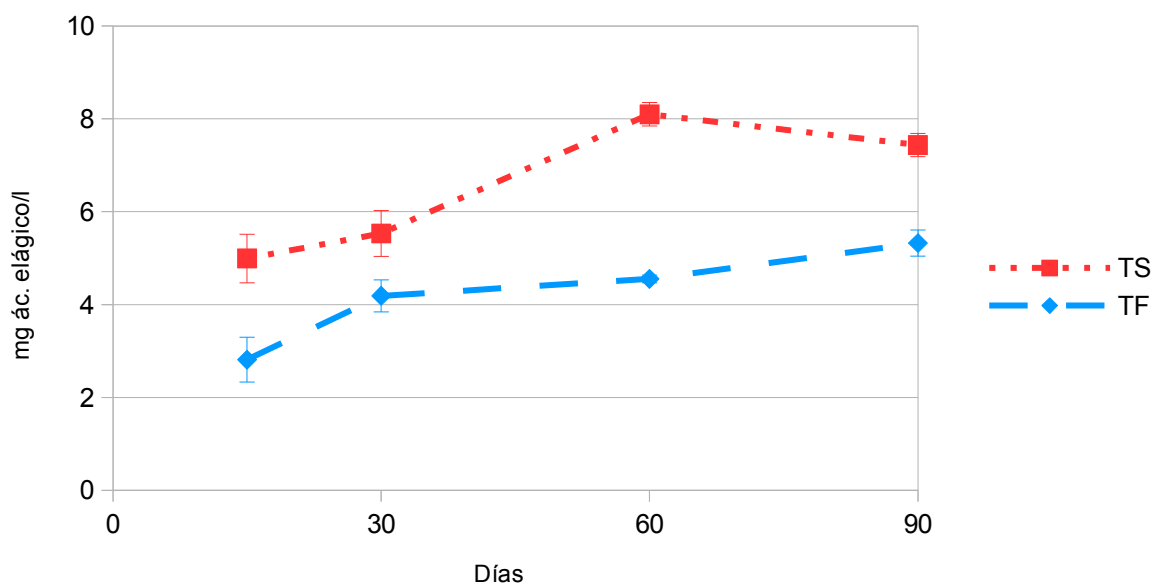


Figura 28: Resultados obtenidos para la estimación de elagitaninos mediante HPLC para vinos tempranillo.

En la Figura 29 se pueden ver los cromatogramas obtenidos para el vino tempranillo con chips de tostado suave a los 90 días. Si se compara con el obtenido con el vino sintético (Figura 22), se observa que en este aparecen más picos debido a los diferentes compuestos que tiene el vino tempranillo y que no tiene el sintético..

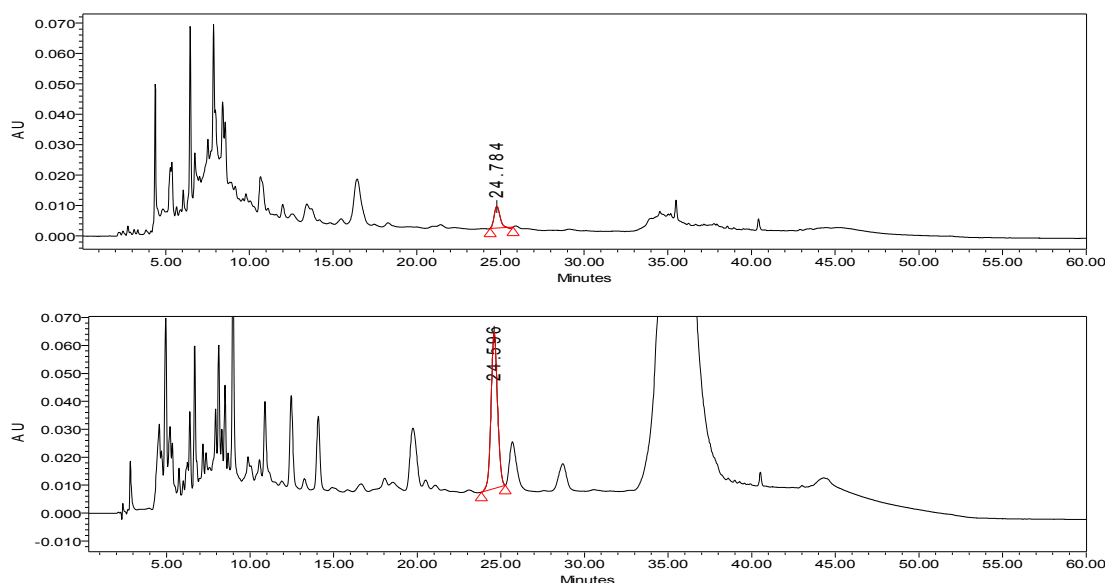


Figura 29. Cromatograma de elagitaninos obtenido para el vino tempranillo con chips de TS (t: 90 días). (a: antes de hidrólisis; b: después de hidrólisis) (*)Nota: El pico integrado se corresponde con el ácido elágico.

En la Tabla 7 se muestra la influencia de las dos variables analizadas (tiempo y chips) en los resultados de los dos métodos de medida de la actividad antioxidante (FRAP y DPPH), de la concentración de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu) así como una posible interacción entre las dos variables.

En las 3 variables estudiadas (Folin, FRAP y DPPH) los valores obtenidos en el vino tempranillo son muchísimo más elevados que en los vinos sintéticos. Esto es lógico, debido a que en el vino real se cuenta ya desde la partida con una gran cantidad de compuestos fenólicos, principalmente flavanoles (catequinas y proantocianidinas) y antocianos. Teniendo en cuenta esto, y los resultados obtenidos en los vinos sintéticos, se puede decir que la aportación de elagitaninos desde los chips no parece importante en términos relativos.

Como se puede observar en la Tabla 7, ambas variables influyen significativamente en los dos parámetros de medida de la actividad antioxidante y además existe interacción entre las dos variables. Por lo tanto hay diferencias en el tiempo y en el contenido de chips y ambos influyen en el vino tempranillo. Pero en el caso de los polifenoles totales, sólo es significativo el factor tiempo, los chips y la interacción de ambos factores no son significativos. Esto significa que no se ve un efecto del tostado de los chips ni de la adición de chips sobre los vinos tempranillo.

Tabla 7. Resultados del ANOVA (tiempo, chips) en las variables polifenoles totales y de capacidad antioxidante en los vinos de tempranillo.

	Polifenoles totales (mg ácido gálico/l)	CA – FRAP (μ M Trolox)	CA – DPPH (μ M Trolox)
p_{tiempo}	0,0000	0,0000	0,0000
0 días	1.356 \pm 21 a	9.989 \pm 110 d	15.103 \pm 105 c
15 días	1.880 \pm 21 c	8.590 \pm 110 c	15.127 \pm 105 c
30 días	1.796 \pm 21 b	8.250 \pm 110 b	13.691 \pm 105 a
60 días	1.889 \pm 21 c	7.387 \pm 110 a	13.682 \pm 105 a
90 días	2.049 \pm 21 d	8.542 \pm 110 bc	14.253 \pm 105 b
p_{chips}	0,4472	0,0099	0,0077
TF	1.810 \pm 16 a	8.335 \pm 85 a	14.535 \pm 82 b
TS	1.789 \pm 16 a	8.645 \pm 85 b	14.409 \pm 82 b
Sin	1.782 \pm 16 a	8.674 \pm 85 b	14.170 \pm 82 a
$p_{\text{interacción}}$	0,7540	0,0001	0,0000

Se presentan el valor p y las medias \pm desviación típica. Dos valores seguidos de letras distintas indican la existencia de diferencias significativas al 95% de confianza.

TF: tostado fuerte, FS: tostado suave, Sin: sin chips.

A grandes rasgos, viendo las medias respecto al factor tiempo, se puede decir que el contenido de polifenoles aumenta conforme avanza el tiempo, pero en el caso de la actividad antioxidante no se aprecia una tendencia clara. Lo mismo ocurre con el contenido en polifenoles totales con respecto al tostado, no se ve claramente la tendencia.

En la Figura 30 se observa como el contenido de polifenoles va aumentando conforme avanza el tiempo y que no existe una diferencia clara entre los diferentes tostados y si lleva o no chips, es decir, parece que los chips no influyen en el contenido de polifenoles, y que éste aumenta con el tiempo.

Estos resultados no coinciden con los observados por Del Alamo et al. (2004), según su estudio durante los dos primeros meses de almacenamiento se da un descenso progresivo en el contenido de polifenoles, y hacia el tercer mes éstos aumentan. Además sus resultados coinciden con los de otros autores, Vivas (1995) y Glories (1996). Por otro lado, en cuanto a los valores que observaron, son similares a los nuestros, aunque ligeramente inferiores, entorno a 1.400 mg ácido gálico/l tanto para los vinos con y sin chips. En cambio, Gallego et al. (2004) encontraron valores superiores para los vinos almacenados con chips durante 6 meses, 2.300 mg ácido gálico/l. Frangipane et al. (2007) si que observaron un aumento en el contenido de polifenoles durante los tres primeros meses del almacenamiento que coincide con los resultados de este estudio. Anteriormente Jindra y Gallender (1987) también habían observado un aumento en los polifenoles totales durante el envejecimiento del vino en contacto con madera de roble como consecuencia de la transferencia de fenoles de la madera al vino.

Estas diferencias observadas pueden ser explicadas por las interacciones que se dan entre los diferentes compuestos y que son debidas a las reacciones de oxidación y al efecto que tienen los fenoles de la madera (Masson et al., 1996).

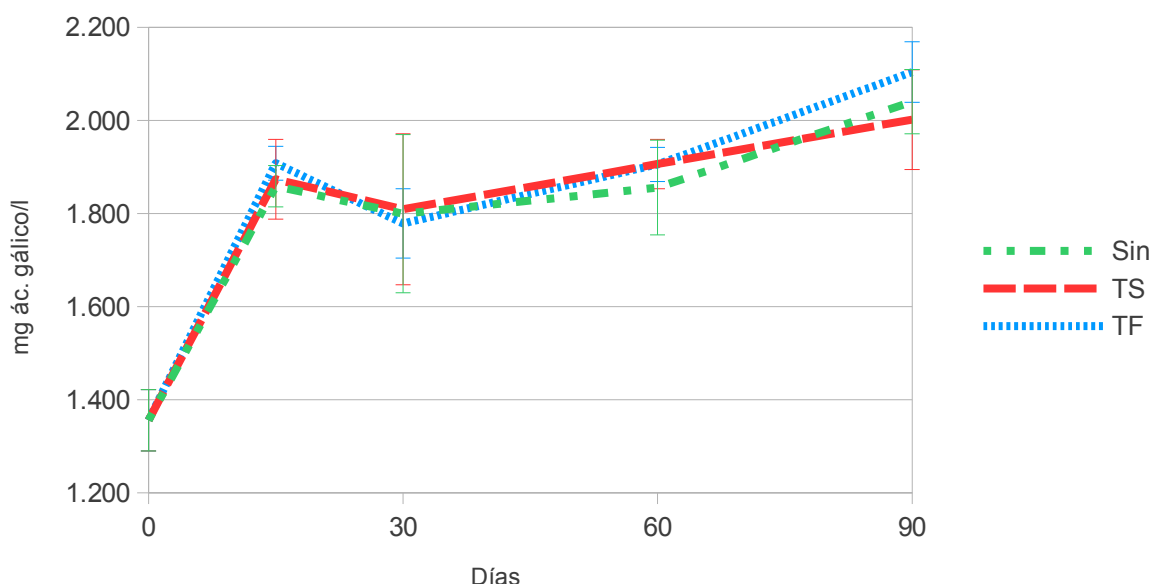


Figura 30. Resultados obtenidos para polifenoles totales mediante el método FOLIN en los vinos tempranillo

Como se puede ver en la Figura 31 parece que la actividad antioxidante mediante el método FRAP sigue una tendencia a la baja, y que para los tres casos disminuye con el tiempo. Esto tiene lógica, ya que según se van dando las reacciones de oxidación en el vino los compuestos van interaccionando entre sí y oxidándose, disminuyendo la capacidad antioxidante del vino. Se observan diferencias entre el vino con chips de tostado fuerte y el vino con chips de tostado suave, éste último paradójicamente tiene un valor de actividad antioxidante similar al del vino sin chips. No obstante, atendiendo a criterios técnicos, y desde un punto de vista relativo, la diferencia, siendo significativa estadísticamente, es muy reducida. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en el caso del vino sintético, vemos que esto no era así, la tendencia era a aumentar con el tiempo, pero eso era porque al ser un vino sintético no hay otros compuestos con los que reaccionar y por eso la capacidad antioxidante iba en aumento.

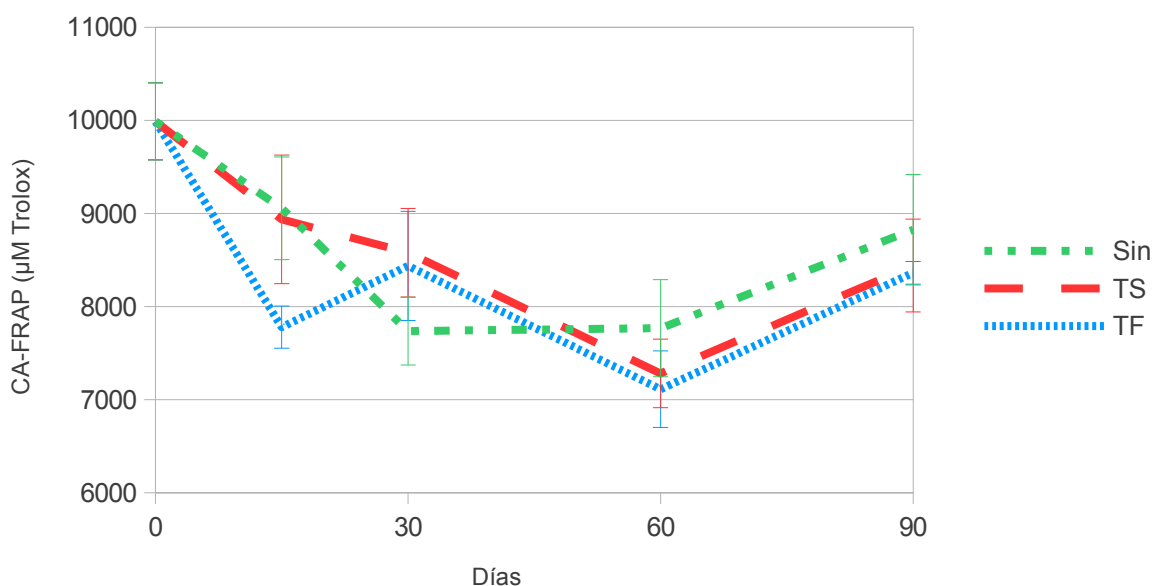


Figura 31. Resultados obtenidos para la capacidad antioxidante mediante el método FRAP en los vinos tempranillo

Algo similar ocurre con la actividad antioxidante medida por el método DPPH, en la Figura 32 se aprecia que según avanza el tiempo de almacenamiento la actividad antioxidante va disminuyendo progresivamente. Además parece que los chips influyen en la actividad antioxidante, ya que la media de los vinos con chips es estadísticamente mayor que la del vino sin chips. No obstante, desde un punto de vista técnico y en términos relativos, las diferencias observadas son muy moderadas.

Respecto a los valores observados para el DPPH, se encuentran en el rango de los valores observados por Gomez Gallego et al. (2012) para diferentes vinos tintos de Castilla La Mancha, que estaban entre 5,94 y 22,1 mmol/l (medido como equivalente de Trolox) y los observados por Fernández Pachón et al. (2004) que se encontraban entre 4,65 y 17,41 mmol Trolox también para vinos tintos.

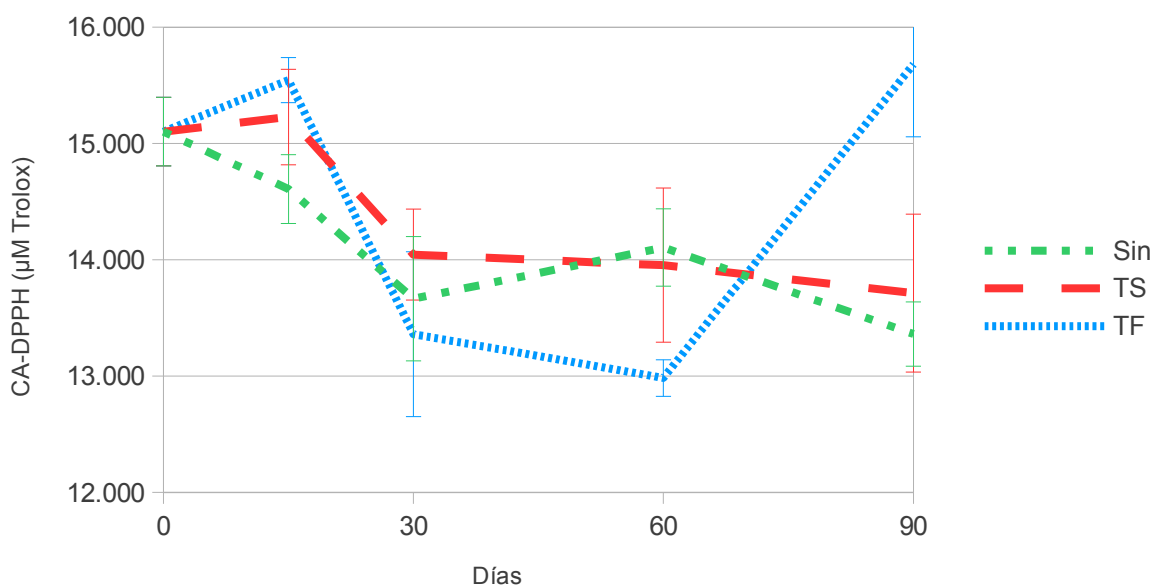


Figura 32. Resultados obtenidos para la capacidad antioxidante mediante el método DPPH en los vinos tempranillo

Para concluir con este apartado se puede decir que cada compuesto polifenólico contribuye de forma diferente a la capacidad antioxidante del vino. Cada polifenol tiene una cierta actividad antioxidante, que se mide en compuestos puros. Sin embargo, en una mezcla como el vino, la capacidad antioxidante no está dada simplemente por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, también está determinada por la interacción entre ellos. Además el aporte a la actividad antioxidante de un vino está dada no sólo por la cantidad de polifenoles sino que el estado en que éstos se encuentren puede influenciar significativamente. Aquí hay que señalar también que la actividad antioxidante de un vino, no sólo va a estar influenciada por la variedad de uva, sino también por el proceso de elaboración, por el envejecimiento del mismo y por otros factores (Rebolo, 2007).

5.3. ANTOCIANOS Y COLOR

Como se observa en la Tabla 8, se encuentran diferencias significativas para todos los parámetros de color, tanto respecto al tiempo como al grado de tostado de los chips.

Atendiendo a los parámetros estándar de intensidad y tonalidad según el tiempo, se observa que primero aumenta la intensidad y después disminuye para alcanzar valores semejantes a los iniciales. En cambio la tonalidad parece que va disminuyendo de forma moderada. Esto puede ser debido a que los componentes de la madera de roble forman nuevos pigmentos derivados de los antocianos que ayudan a la estabilización de la intensidad del color (Cano-Lopez et al., 2006). Además a medida que nos alejamos en el tiempo de almacenamiento se observa un aumento constante de la coordenada b^* (amarilla), esto es muy habitual en los vinos más envejecidos o según avanza el envejecimiento, ya que tienden a tonos más amarillentos o incluso marrones con el tiempo. En este caso la coordenada a^* (roja) sigue la misma tendencia que la b^* y aumenta con el tiempo, aunque lo normal durante el envejecimiento suele ser que disminuya ligeramente en el tiempo. Este hecho puede estar asociado a los chips y a que ayuden a mantener el color rojo del vino. Asimismo, parece que el aumento del parámetro rojo compensa en cierto modo el aumento del parámetro amarillo, de forma que la aunque disminuye con el tiempo, lo hace de forma bastante moderada. El parámetro L^* que indica la claridad o luminosidad del vino también aumenta con el tiempo, es decir, el vino se va volviendo más luminoso o claro.

Si atendemos a la Tabla 8 y analizamos los datos obtenidos según el contenido de chips, se puede afirmar que éste afecta a todos los parámetros del color ya que se han diferenciado dos grupos: los que no tienen chips y los que sí. Aunque de nuevo en términos relativos las diferencias son muy moderadas, se observa que los vinos con chips presentan menor intensidad colorante, mayor tonalidad y luminosidad, y valores superiores tanto en las componentes amarilla como en la roja, que el vino sin chips.

Tabla 8: Resultados del ANOVA (tiempo, chips) en las variables de color en los vinos tempranillo.

	Intensidad	Tonalidad	L^*	a^*	b^*
p_{tiempo}	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0 días	10,86 \pm 0,03 b	0,563 \pm 0,001 e	10,83 \pm 0,09 a	41,07 \pm 0,12 a	18,37 \pm 0,14 a
15 días	10,69 \pm 0,03 a	0,551 \pm 0,001 d	13,58 \pm 0,09 b	45,30 \pm 0,12 b	23,14 \pm 0,15 b
30 días	12,63 \pm 0,03 c	0,531 \pm 0,001 a	11,39 \pm 0,09 c	42,50 \pm 0,12 c	19,53 \pm 0,14 c
60 días	10,85 \pm 0,03 b	0,533 \pm 0,001 b	14,24 \pm 0,09 d	46,55 \pm 0,12 d	24,29 \pm 0,14 d
90 días	10,85 \pm 0,03 b	0,549 \pm 0,001 c	14,85 \pm 0,09 e	47,54 \pm 0,12 e	25,32 \pm 0,15 e
p_{chips}	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
TF	11,07 \pm 0,03 a	0,550 \pm 0,001 b	13,22 \pm 0,07 b	44,95 \pm 0,09 b	22,53 \pm 0,11 b
TS	11,05 \pm 0,03 a	0,548 \pm 0,001 b	13,21 \pm 0,07 b	44,93 \pm 0,09 b	22,49 \pm 0,11 b
Sin	11,41 \pm 0,03 b	0,538 \pm 0,001 a	12,51 \pm 0,07 a	43,89 \pm 0,09 a	21,37 \pm 0,11 a
$p_{\text{interacción}}$	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Se presentan el valor p y las medias \pm desviación típica. Dos valores seguidos de letras distintas indican la existencia de diferencias significativas al 95% de confianza.

TF: tostado fuerte, FS: tostado suave, Sin: sin chips.

En las Tablas 9.1, 9.2 y 9.3 se muestra la existencia o no de una influencia significativa (valor p) de las dos variables analizadas (tiempo y chips) para el contenido de antocianos en los vinos tempranillo. Primero están los antocianos monoglucósidos no acilados (Tabla 9.1.), luego los acilados (Tabla 9.2.) y, por último, se ha incluido un sumatorio de ambos a modo de resumen (Tabla 9.3.). Se han incluido las medias y la desviación estándar de cada parámetro para los distintos niveles de tiempo y chips. Así mismo se indica la existencia o no de una interacción significativa entre ambas variables.

Como se puede observar en la Tabla 9.1. el antociano que se encuentra en mayor cantidad en los vinos analizados es el monoglucósido de malvidina, como sucede en la mayoría de vinos pertenecientes al género Vitis (Zamora, 2003). El segundo antociano más abundante es el monoglucósido de delphinidina, seguido muy de cerca por el monoglucósido de petunidina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros investigadores como Hebrero et al. (1989). Por el contrario, el monoglucósido que se encuentra en menor cantidad es el monoglucósido de cianidina. En la Figura 33 se puede observar el cromatograma obtenido para una de las muestras donde se ven claramente los diferentes picos obtenidos para los diferentes tiempos de retención.

Tabla 9.1: Resultados del ANOVA (tiempo, chips) de los antocianos en los vinos tempranillo.

	Monoglucósido de delphinidina (mg/l)	Monoglucósido de cianidina (mg/l)	Monoglucósido de petunidina (mg/l)	Monoglucósido de peonidina (mg/l)	Monoglucósido de malvidina (mg/l)
p_{tiempo}	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0 días	75,03 \pm 1,09 d	8,90 \pm 0,17 c	71,73 \pm 0,95 c	24,10 \pm 0,36 b	297,50 \pm 2,92 d
30 días	72,81 \pm 1,09 bc	6,72 \pm 0,17 ab	71,40 \pm 0,95 c	33,40 \pm 0,36 a	264,13 \pm 2,92 c
60 días	70,76 \pm 1,09 b	6,47 \pm 0,17 a	66,90 \pm 0,95 b	21,26 \pm 0,36 a	242,08 \pm 2,92 b
90 días	61,70 \pm 1,09 a	7,03 \pm 0,17 b	59,83 \pm 0,95 a	20,53 \pm 0,36 a	220,26 \pm 2,92 a
p_{chips}	0,3774	0,7562	0,1947	0,2122	0,3388
TF	69,57 \pm 0,94 a	7,24 \pm 0,15 a	66,84 \pm 0,82 a	24,12 \pm 0,31 a	255,80 \pm 2,53 a
TS	69,50 \pm 0,94 a	7,37 \pm 0,15 a	66,86 \pm 0,82 a	23,69 \pm 0,31 a	253,45 \pm 2,53 a
Sin	71,15 \pm 0,94 a	7,23 \pm 0,15 a	68,70 \pm 0,82 a	24,48 \pm 0,31 a	258,74 \pm 2,53 a
$p_{\text{interacción}}$	0,6750	0,4851	0,2691	0,7454	0,2050

Se presentan el valor p y las medias \pm desviación típica. Dos valores seguidos de letras distintas indican la existencia de diferencias significativas al 95% de confianza.

TF: tostado fuerte, FS: tostado suave, Sin: sin chips

Tabla 9.2.: Resultados del ANOVA (tiempo, chips) de los antocianos en los vinos tempranillo.

	Acetato del monoglucósido de peonidina (mg/l)	Acetato del monoglucósido de malvidina (mg/l)	p-Cumarato del monoglucósido de petudina (mg/l)	P-Cumarato del monoglucósido de de peonidina (mg/l)	P-Cumarato del monoglucósido de malvidina (mg/l)
p_{tiempo}	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0 días	3,33 ± 0,22 a	12,63 ± 0,23 a	8,07 ± 0,09 d	6,23 ± 0,09 d	33,17 ± 0,26 d
30 días	5,93 ± 0,22 b	18,72 ± 0,23 d	6,74 ± 0,09 c	5,42 ± 0,09 c	26,59 ± 0,26 c
60 días	6,35 ± 0,22 b	17,07 ± 0,23 c	6,27 ± 0,09 b	4,83 ± 0,09 b	22,49 ± 0,26 b
90 días	8,76 ± 0,22 c	15,82 ± 0,23 b	5,62 ± 0,09 a	4,16 ± 0,09 a	19,34 ± 0,26 a
p_{chips}	0,8623	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
TF	6,02 ± 0,19 a	15,48 ± 0,20 a	6,44 ± 0,08 a	4,98 ± 0,08 a	24,72 ± 0,22 a
TS	6,17 ± 0,19 a	15,78 ± 0,20 a	6,45 ± 0,08 a	5,01 ± 0,08 a	24,76 ± 0,22 a
Sin	6,10 ± 0,19 a	16,92 ± 0,20 b	7,14 ± 0,08 b	5,49 ± 0,08 b	26,72 ± 0,22 b
$p_{\text{interacción}}$	0,8613	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Se presentan el valor p y las medias ± desviación típica. Dos valores seguidos de letras distintas indican la existencia de diferencias significativas al 95% de confianza.

TF: tostado fuerte, FS: tostado suave, Sin: sin chips.

Tabla 9.3.: Resultados del ANOVA (tiempo, chips) de los antocianos en los vinos tempranillo.

	Monoglucósidos no acilados (mg/l)	Monoglucósidos acilados (mg/l)	Antocianos totales (mg/l)
p_{tiempo}	0,0000	0,0000	0,0000
0 días	486,57 ± 5,10 d	63,47 ± 0,61 c	550,03 ± 5,55 d
30 días	436,33 ± 5,10 c	63,38 ± 0,61 c	499,72 ± 5,55 c
60 días	407,39 ± 5,10 b	57,04 ± 0,61 b	464,44 ± 5,55 b
90 días	369,34 ± 5,10 a	53,69 ± 0,61 a	423,04 ± 5,55 a
p_{chips}	0,3058	0,0000	0,1067
TF	423,58 ± 4,42 a	57,63 ± 0,53 a	481,22 ± 4,81 ab
TS	420,86 ± 4,42 a	58,18 ± 0,53 a	479,03 ± 4,81 a
Sin	430,29 ± 4,42 a	62,38 ± 0,53 b	492,67 ± 4,81 b
$p_{\text{interacción}}$	0,3355	0,0000	0,1691

Se presentan el valor p y las medias ± desviación típica. Dos valores seguidos de letras distintas indican la existencia de diferencias significativas al 95% de confianza.

TF: tostado fuerte, FS: tostado suave, Sin: sin chips.

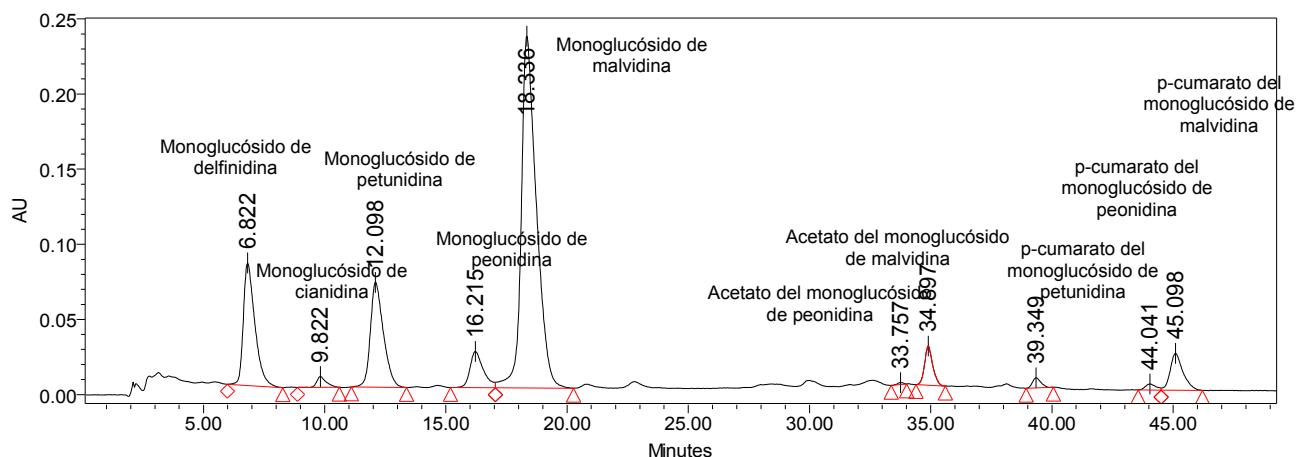


Figura 33. Cromatograma obtenido para una muestra de vino tempranillo.

En la Figura 34 se puede apreciar como los antocianos totales van disminuyendo a lo largo del ensayo, pero si prestamos atención a las Figuras 35 y 36 vemos que son los antocianos monoglucósidos los que más disminuyeron durante el tiempo del ensayo ya que los antocianos acilados se mantienen más o menos, pero con una pequeña disminución. Esta disminución de los antocianos monoglucósidos se puede atribuir a las reacciones de condensación y no a la degradación de pigmentos rojos ya que la componente a^* del color aumentó durante este periodo. Además, como se puede observar en la Tabla 9.2. parece que los acetatos de peonidina y malvidina aumentaron durante este tiempo. El resto de antocianos disminuyeron con el tiempo, estos resultados coinciden con los obtenidos por Cano et al. (2010) para vinos envejecidos en barricas de roble.

En cuanto al efecto de los chips, según se aprecia en las Tablas 9.1, 9.2 y 9.3 y en las Figuras 34, 35 y 36, se puede decir que el factor de los chips no presentó una influencia significativa en el contenido en antocianos de los vinos. Las diferencias estadísticamente significativas observadas en algunos antocianos acilados son muy moderadas en términos relativos. Estos resultados concuerdan con los encontrados por varios autores (Del Alamo et al., 2004; De Conninck et al., 2006; Frangipane et al., 2007) que vieron que la adición de chips no tiene gran efecto en la composición fenólica y en los parámetros de color de los vinos. Por el contrario, hay otros autores que afirman que existen diferencias; por ejemplo, Alañón et al. (2013) observaron diferencias significativas en vinos tempranillo al añadir chips de castaño, en especial en las formas no aciladas de los antocianos.

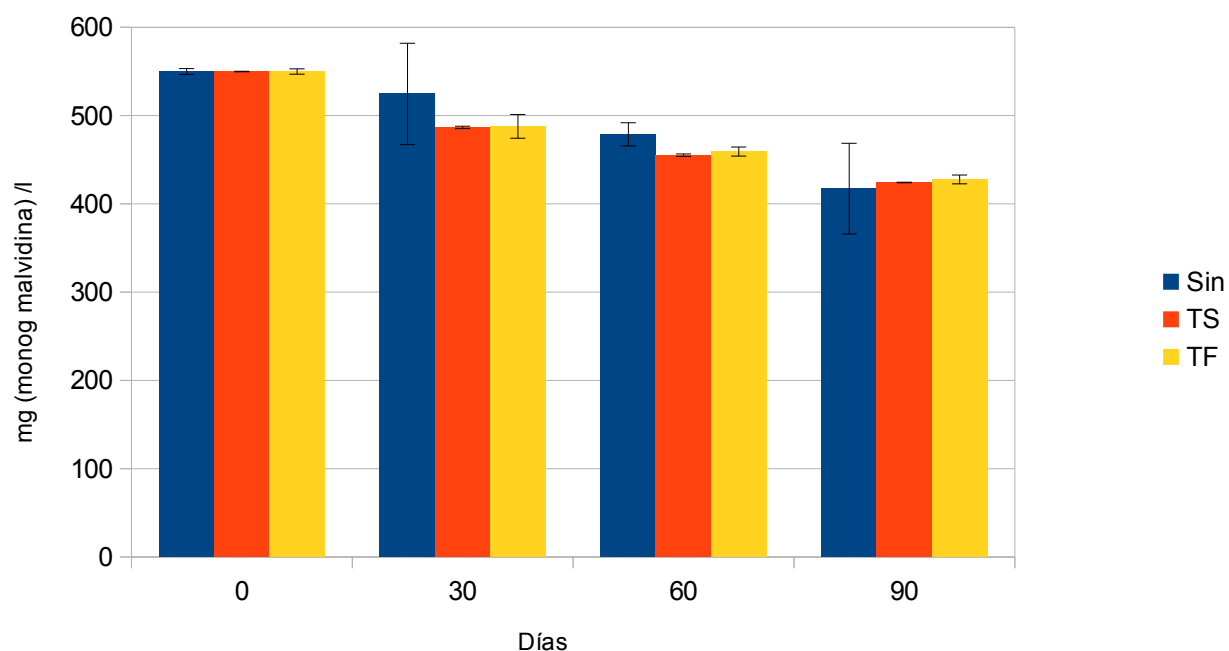


Figura 34. Resultados obtenidos para el contenido de antocianos totales mediante HPLC en los vinos tempranillo.

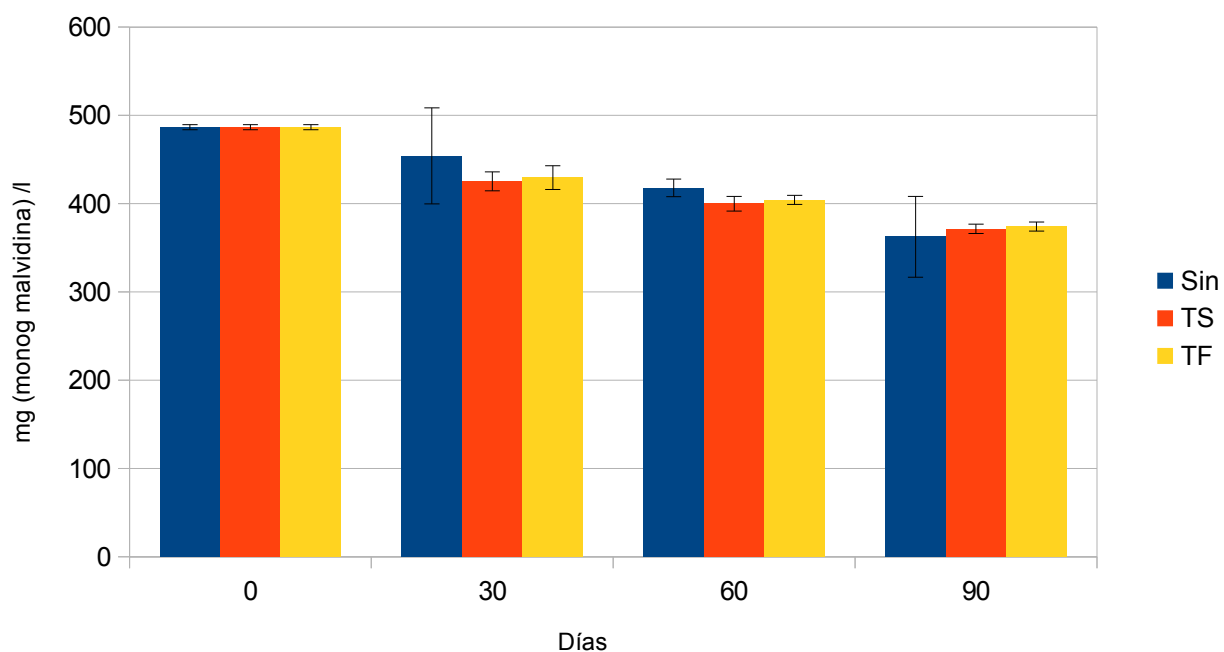


Figura 35. Resultados obtenidos para el contenido de antocianos monoglucósidos mediante HPLC en los vinos tempranillo.

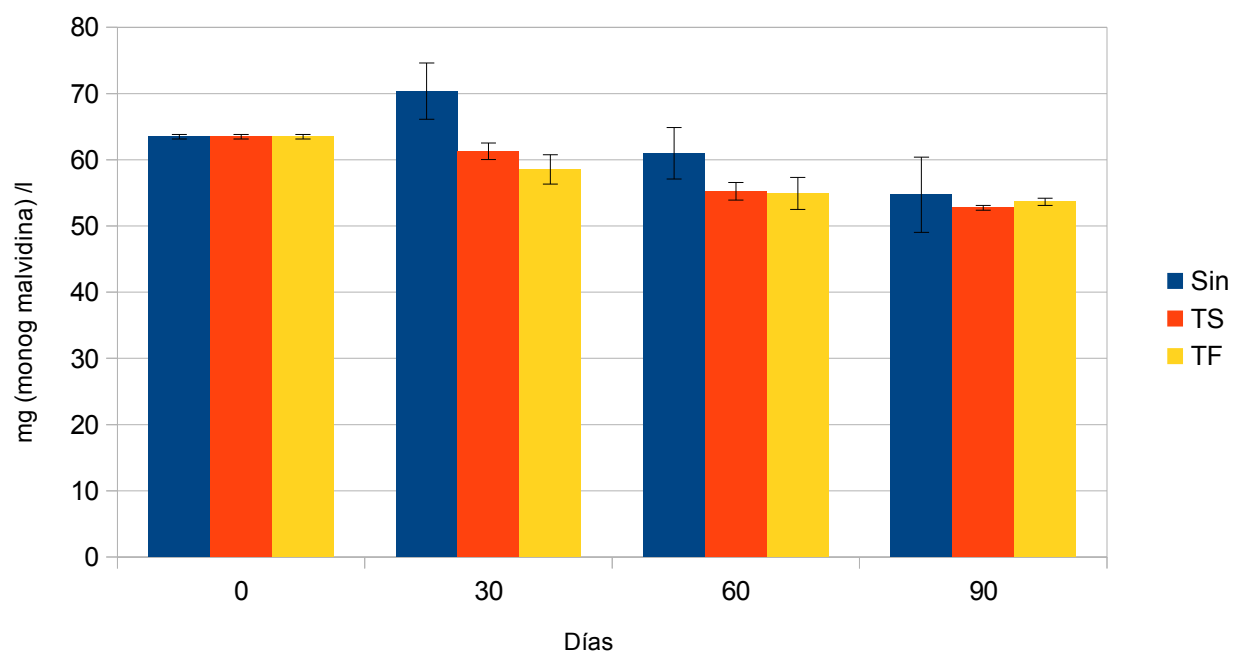


Figura 36. Resultados obtenidos para el contenido de antocianos acilados mediante HPLC en los vinos tempranillo.

6.- CONCLUSIONES

- Se ha visto que al incorporar chips en un vino sintético durante tres meses la cesión de elagitaninos es mayor al inicio del almacenamiento y luego parece estabilizarse, siguiendo una curva exponencial. Los parámetros de polifenoles totales y actividad antioxidante (DPPH y FRAP) siguen esta misma tendencia.
- Se ha visto que el nivel de tostado influye en la cinética de cesión y en la cantidad de elagitaninos extraídos desde los chips al vino. A mayor tostado menor es la cesión y la cinética de extracción se vuelve más lenta. Esto se vio claramente en los vinos sintéticos, ya que no había otros compuestos que condicionaran la difusión de los elagitaninos desde los chips al líquido.
- En el vino tempranillo se ha visto que la extracción de elagitaninos aumenta con el tiempo y que también el contenido es mayor en los vinos con chips de tostado suave. En este caso el contenido en polifenoles aumenta con el tiempo y la actividad antioxidante disminuye.
- A pesar de que en el vino sintético se ve claramente que el contenido de chips aumenta la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales, parece que este efecto no es tan significativo en los vinos tempranillo debido a que existen ya de partida otros muchos compuestos fenólicos y la aportación de los elagitaninos no parece tan importante en términos relativos.
- En cuanto al color se puede decir que las diferencias debido al factor chips son muy moderadas, observándose que los vinos con chips presentan menor intensidad colorante, mayor tonalidad y luminosidad, y valores superiores en las componentes amarilla y roja, que el vino sin chips.
- Los antocianos totales disminuyen con el tiempo y parece que el factor chips no presenta una influencia significativa en su evolución.

BIBLIOGRAFÍA

Alañón, M. E.; Castro-Vázquez, L.; Díaz-Maroto, M. C.; Gordon, M. H.; Pérez-Coello, M. S. (2011). A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. *Food Chemistry*, 128(4): 997–1002.

Alañón, M. E.; Schumacher, R.; Castro Vázquez, L.; Díaz Maroto, M. C.; Hermosín Gutiérrez, I.; Pérez Coello, M. S. (2013). Enological potencial of chestnut wood for aging Tempranillo wines Part II: Phenolic compounds and chromatic characteristics. *Food Research International* 51: 536-543.

Al-Duais, M.; Müller, L.; Böhm, V.; Jetschke, G. (2009). Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. *European Food Research and Technology*, 228: 813-821.

Arapitsas, P.; Antonopoulos, A.; Stefanou, E.; Dourtoglou, V.G. (2004) Artificial aging of wines using oak chips. *Food Chem* 86: 563–570

Arnao, M. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 11(11): 419-421.

Augustin, M.M. (1986); Étude de l'influence de certains facteurs sur les composés phénoliques du raisin et du vin. Thèse, université de Bordeaux II.

Baderschneider, B.; Luthria, D.; Waterhouse, A.L.; Winterhalter, P. (1999). Antioxidants in white wine (cv. Riesling): I. comparison of different testing methods for antioxidant activity. *Vitis*, 38 (3): 127-131.

Bakker, J. (1985). Studies on the colors and pigments of port-wines. Dissertation, The University of Bristol.

Bakker, J.; Preston, N. W.; Timberlake, C.F. (1986). The determination of anthocyanins in aging red wines: comparison of HPLC and spectral methods. *Am J Enol Vitic*, 37: 121.

Benzie, I. F. F. ; Chung, W.Y.; Strain, J.J. (1999). Antioxidant (reducing) efficiency of ascorbate in plasma is not affected by concentration. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 10: 146-150.

Béteau, J.; Roig Josa, G. Los chips de roble como herramienta de vinificación y crianza. http://www.acenologia.com/ciencia76_01.htm (15/06/2014)

BoboGarcía, G.; Davidov Pardo, G.; Arroqui, C.; Vírveda, P.; Marín Arroyo, M.R.; Navarro, M. (2014). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on

polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *J Sci Food Agric*.

Boulton R. El fenómeno de copigmentación en los vinos tintos. Seminario Internacional hacia la Enología del Siglo XXI.

Boulton, R. (2001) The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am J Enol Vitic* 52: 67–87.

Brand-Williams, W. ; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food science and technology*, 28(1): 25-30.

Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56: 317-333.

Cano López, M.; Pardo, F.; López Roca, J.M.; Gómez Plaza, E. (2006). Effect of micro-oxygenation on anthocyanin and derived pigment content and chromatic characteristics of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57: 325-331.

Cano López, M.; López Roca, J.M.; Pardo Minguez, F.; Gómez Plaza, E. (2010). Oak barrel maturation vs. Micro-oxygenation: Effect on the formation of anthocyanin-derived pigments and wine colour. *Food Chemistry* 119: 191-195.

Chatonnet, P.; Dubordieu, D.; Boidron, J.N.; Lavigne, V. (1993). Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J Sci Food Agric*, 62: 191-202.

Cheyrier, V.; Moutonet, M. (1992). Oxidative reactions of caffeic acid in model system containing polyphenoloxidase. *J Agric Food Chem*, 40: 2038-2044.

Cheyrier, V., M.; Moutonet, P. ; Sami-Manchado (1998). Les composés phénoliques. En *Oenologie, fondements scientifiques et technologiques*. C. Flanzy. (Eds) Mundi Prensas. Paris.115-176.

Cheyrier, V.; Rigaud, J.(1986). HPLC Separation and characterisation of flavonols in the skins of *Vitis Vinifera* var. Cinsaut. *Am. J. Enol. Vitic*. 37: 248-252.

Chira, K.; Teissedre, P.L. (2013). Relation between volatile composition, ellagitannin content and sensory perception of oak wood chips representing different toasting processes. *European Food Research and Technology*, 236: 735-746.

Chira,K.; Teissedre, P.L. (2013). Extraction of oak volatiles and ellagitannins compounds and sensory profile of wine aged with French winewoods subjected to different toasting methods: Behaviour during storage. *Food Chemistry*, 140: 168-177.

- Cilliers, J.J.L.; Singleton, V. (1989). Nanoenzymic autoxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. *J Agric Food Chem*, 37: 890-896.
- Cilliers, J.J.L.; Singleton, V. (1991). Characterisation of the products of non enzymatic autoxidative phenolic reaction in a caffeic acid model system. *J Agric Food Chem*, 39: 1298-1303.
- CIVB. Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux (1999). Elevage en barriques des vins rouges de Bordeaux. Les Cahiers Techniques de CIVB. Hors série n° 1
- Corder R. (2008). Red wine, chocolate and vascular health: developing the evidence base. *HEART Vol.94*, (7): 821-823.
- Dadic, M.; Belleau, G. (1973). Polyphenols and beer flavor. *Proceedings of the American Society of Brewing Chemists* 4:107-114.
- De Coninck, G.; Jordao, A.M.; Ricardo Da Silva, J.M.; Laureano, O. (2006) Evolution of phenolic composition and sensory properties in red wine aged in contact with Portuguese and French oak wood chips. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 40: 25–34
- Del Alamo Sanza, M.; Fernandez Escudero, J.A.; De Castro Torio, R. (2004). Changes in phenolic compounds and colour parameters of red wine aged with oak chips and in oak barrels. *Food Science and Technology International* 10: 233-241.
- Del Alamo Sanza, M.; Nevares Domínguez, L.; Carce, L.M.; Navas Gracia, L. (2004) Analysis for low molecular weight phenolic compounds in a red wine aged in oak chips. *Anal Chim Acta* 513: 229–237.
- Del Alamo, M.; Nevares, I.; Cárcel, L.M. (2006). Redox potential evolution during red wine aging in alternatives systems. *Analytica Chimica Acta* 563: 223-228.
- Del Alamo Sanza, M.; Nevares Domínguez, I. (2006). Wine aging in bottle from artificial systems (staves and chips) and oak woods: Anthocyanin composition. *Anal Chim Acta* 563: 255–263.
- Doussot, F., De Jéso, B., Quideau, S., Pardon, P. (2002). Extractives content in cooperage oak wood during natural seasoning and toasting; influence of tree species, geographic location, and single-tree effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21): 5955–5961.
- Dubois, P.; Dekimpe, J. (1982). Constituants volatils odorants des vins de Bourgogne élevés en fûts neuf chêne. *Rev Fr Oenol*, 88: 51-53.
- Dubois, P. (1989). Apports du fût de chêne neuf à l'arôme des vins. *Rev Fr Oenol*, 120: 19-24.

- Fernández-Pachón, M. S.; Villaño, D.; García-Parrilla, M. C.; Troncoso, A. M. (2004). Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta*, 513: 113–118.
- Fernández-Pachón, M.S.; Villaño, D.; Troncoso, A.M.; García-Parrilla, M.C. (2006). Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. *Analytica Chimica Acta*, 563: 101-108.
- Frangipane, M.T.; Santis, D.D.; Ceccarelli A. (2007) Influence of oak woods of different geographical origins on quality of wines aged in barriques and using oak chips. *Food Chem* 103: 46–54 .
- Frankel, E.N.; Waterhouse, A.L.; Teissedre, P.L. (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 43: 890.
- Fulcrand, H.; Cheminat, A.; Brouillard, R.; Cheynier, V. (1994). Characterization of compounds obtained by chemical oxidation of caffeic acid in acidic conditions. *Phytochemistry*, 35: 499-505.
- Gallego, L., Del Alamo, M., Nevares, I.; Fernández, J.A.; De Simón, B.F.; Cadahía, E. (2012) Phenolic compounds and sensorial characterization of wines aged with alternative to barrel products made of Spanish oak wood (*Quercus pyrenaica* Willd.). *Food Sci Technol Int* 18: 151–165.
- García-Puente Rivas, E.; Alcalde-Eon, C.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, C.; Escribano-Bailon, M. T. (2005). Behaviour and characterization of the colour during red wine making and maturation. *Analytica Chimica Acta*, 563: 215–222.
- Glabasnia, A.; Hofmann, T. (2006). Sensory-directed identification of taste-active ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and European oak wood (*Quercus robur* L.) and quantitative analysis in bourbon whiskey and oak-matured red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9): 3380–3390.
- Glories, Y. (1978). Recherche sur la matière colorante des vins rouges. Thèse, université de Bordeaux II.
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 2e. Partie: Mesure, origine et interpretation. *Conn. Vigne Vin*, 18 (4): 253-271.
- Glories Y. (1991). Phénomènes oxydatifs liés à la conservation sous bois. *Journal International Sciences de la Vigne et du Vin: le bois et la qualité des vins et eaux-de- vie (special issue)*: 93–104.
- Gómez Galleo, M.A.; Gómez García Carpintero, E.; Sánchez Palomo, E.; González Viñas, M.A.; Hermosín Gutierrez, I. (2012). Oenological potencial, phenolic composition, chromatic characteristics and antioxidant activity of red single-cultivar wines from Castilla-La Mancha. *Food Research International* 48: 7-15.

Gonzalez del Pozo, A.; Arozarena, I.; Noriega, M.J.; Navarro, M., Casp, A. (2010). Short and long-term effects of micro-oxygenation treatments on the colour and phenolic composition of a Cabernet Sauvignon wine aged in barrels and/or bottles. *European Food Research and Technology*, 231: 589-601.

González-Paramás, A.; Esteban-Ruano, S.; Santos-Buelga, C.; De Pascual-Teresa, S.; Rivas-Gonzalo, J. (2004). Flavanol Content and Antioxidant Activity in Winery Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 234-238.

Guchu, E.; Perez-Coello, M.S.; González-Viñas, M.A.; Cabezudo, M.D. (2006) Volatile composition and sensory characteristics of Chardonnay wines treated with American and Hungarian oak chips. *Food Chem* 99: 350–359

Guilloux, M. (1981). Évolution des composés phénoliques de la grappe pendant la maturation du raisin. Influence des facteurs naturels. Thèse, Doctorat de l'université de Bordeaux II.

Günata, Y.Z.; Sapis, J.; Moutounet, M. (1986). Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of grape phenol oxidases. *Phytochemistry*, 26: 1-3.

Ghiselli, A.; Nardini, M.; Baldi, A.; Scaccini, C. (1998). Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *J. Agric. Food Chem.* 46: 361 .

Guyot, S.; Vercauteren, J.; Cheynier, V. (1996). Colourless and yellow dimers resulting of (+) catechins oxidative coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochem*, 42: 1279-1288.

Hebrero, E.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. (1989). Analysis of anthocyanins by H.P.L.C. - Diode Array Spectroscopy in a hybrid grape variety (*Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri* 41B). *Am. J. Enol. Vitic.* 40 (4): 283-291.

Herald, T.J.; Gadgil, P.; Tilley, M. (2012). High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(11): 2326-2331.

Karadag, A.; Ozcelik, B.; Saner, S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2: 41-60.

Jindra, J.A.; Gallender, J.F. (1987). Effect of American and French oak barrels on the phenolic composition and sensory quality of Seyval blanc wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 38: 133-138.

Jordão, A. M.; Ricardo Da Silva, J. M. (2006). Effect of oak constituents and oxygen on the evolution of malvidin-3-glucoside and (+)-catechin in model wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57: 377–381.

Jordão, A. M.; Ricardo Da Silva, J. M.; Laureano, O.; Mullen, W.; Crozier, A. (2008). Effect of ellagitannins, ellagic acid and volatile compounds from oak wood on the (+)-catechin, procyanidin B1 and malvidin-3-glucoside content of model wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14(3): 260–270.

Jordao, A.M.; Correia, A.C.; Del Campo, R.; González, M. (2012). Antioxidant capacity, scavenger activity, and ellagitannins content from commercial oak pieces used in winemaking. *Eur Food Res Technol*.

Jourdes, M.; Michel, J.; Saucier, C.; Quideau, S.; Teissedre, P.L. (2011). Identification, amounts, and kinetics of extraction of C-glucosidic ellagitannins during wine aging in oak barrels or in stainless steel tanks with oak chips. *Anal Bioanal Chem*, 401:1531-1539.

Kinsella, J. E.; Frankel, E.; German, B.; Kanner, J. (1993). Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant *foods*. *Food Technol*. 85.

Koussissi, E.; Dourtoglou, V. G.; Ageloussis, G.; Paraskevopoulos, Y.; Dourtoglou, T.; Paterson, A. (2009). Influence of toasting of oak chips on red wine maturation from sensory and gas chromatographic headspace analysis. *Food Chemistry*, 114(4): 1503–1509.

Larrauri, J.A.; Sánchez-Moreno, C.; Rupérez, P.; Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity in the aging of selected red Spanish wines. *J. Agric. Food Chem*. 47: 1603.

Leighton, F.; Urquiaga, I. (1999). Los componentes del vino y sus efectos beneficiosos para la salud. <http://www.fac.org.ar/revista/00v29n2/leighton/leighton.htm> (11/05/2014)

Magalhaes, L.M.; Segundo, M.A.; Reis, S.; Lima, J.L.F.C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1): 1-19.

Masson, G.; Puech, J. L.; Moutounnet, M. (1996). Composition chimique du bois de chene de tonnellerie. *Bulletin de l'O.I.V.* 1635– 1655.

Michel, J.; Jourdes, M.; Silva, M. A.; Giordanengo, T.; Mourey, N.; Teissedre, P. L. (2011). Impact of concentration of ellagitannins in oak wood on their levels and organoleptic influence in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10): 5677–5683.

Masson, E.; Baumes, R.; Moutounet, M.; Puech, J.L. (2000). The effect of kiln-drying on the levels of ellagitannins and volatile compounds of European oak (*Quercus petraea* Liebl.) stave wood. *Am J Enol Vitic* 51: 201–214.

Masson, G. (1996). Composition chimique du bois de chêne de tonnellerie. Essai de discrimination des especes et des forêts. Thèse de doctorat ès sciences, université de Montpellier II.

- Morata, A. C. (2006). Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (Vitisins A and B) in red wines by the addition of piruvic acid and acetaldehyde. Food Chem.
- Moreno, J.J.; Peinado, R.A. (2010). *Química enológica*. Editado por AMV Ediciones y Mundi-Prensa. 1ª edición, 2010.
- Mosedale, J. R.; Puech, J.L.; Feuillat, F. (1999). The influence on wine flavor of the oak species and natural variation of heartwood components. American Journal of Enology and Viticulture, 50(4): 503–512.
- Müller, L.; Gnoyke, S.; Popken, A.M.; Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. Food science and technology, 43(6): 992-999.
- Ojeda H. (2000). Los compuestos polifenólicos de la uva. EEA Mendoza, INTA.
- Oszmianski, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. (1996). Iron-catalysed oxidation of (+) catechin in model systems. J Agric Food Chem, 44: 1712-1715.
- Peng, S.; Scalbert, A.; Monties, B. (1991). Insoluble ellagitannins in *Castanea sativa* and *Quercus petraea* woods. Phytochemistry 30: 775–778
- Pérez-Magariño, S.; González-San José, M. L. (2004). Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the aging of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(5): 1181–1189.
- Peyron, D.; Boukharta, M.; Feuillat, M. (1994). Evolution de la composition phénoliques au cours e l'élevage des vins rouges en relation avec la qualité des bois de chêne de tonnellerie. Rev Fr Oenol, 146: 5-10.
- Piracci, A.; Bucelli, P.; Faviere, V; Giannetti, F.; Lo Scalzo, R.; Novello, E. (2001). Frammenti legnosi oak-chips e staves: contributo alla stabilizzazione del colore. L'Enologo Nro 10: 103-109.
- Prior, R. L.; Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. Free Radical Biology and Medicine, 27(11-12): 1173-1181.
- Quideau, S., Jourdes, M., Lefeuvre, D., Montaudon, D., Saucier, C., Glories, Y., et al. (2005). The chemistry of wine polyphenolic C-glycosidic ellagitannins targeting human topoisomerase II. Chemistry – A European Journal, 11(22): 6503–6513.
- Romero, C.; Bakker,J. (2000). Effect of acetaldehyde and several acids on the formation of vitisin A in model wine anthocyanin composition and color in model solutions. Food Chem, 35: 129-140.

Rebolo S. (2007). Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con D.O.: Ribeiro, Vadeorras y Ribeira Sacra. Universidad de Santiago de Compostela.

Ribéreau-Gayon, P. (1976). *Traite d'oenologie. Sciences et techniques du vin*, Ed. Dunod. Paris.

Ribéreau-Gayon, P. (1982). The anthocyanins of grapes and wines, in *Anthocyanins as food colors*. Ed. Markakis New York Academic Press, , 209-244.

Ribereau Gayon, P.; Maujean, A.; Glories, Y.; Duboudieu, D. (2003). *Tratado de enología*.

Rimm, E.B.; Klatsky, A.; Grobbee, D.G.; Stampfer, M.J. (1996). Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: Is the effect due to beer, wine, or spirits? *Br Med J*; 312: 731-6.

Rodríguez Rodríguez, P.; Gómez Plaza, E. (2011). Differences in the extraction of volatile compounds from oak chips in wine and model solutions. *Am J Enol Vitic* 62: 127-132.

Romeyer, F.M.; Macheix, J.J.; Goiffon, J.J.; Reminiac, C.C.; Sapis, J.C.J. (1983). The browning capacity of grapes. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit . *Agric. Food Chem.* 31: 339-346.

Sáenz-Navajas, M. P.; Fernández-Zurbano, P.; Ferreira, V. (2012). Contribution of nonvolatile composition to wine flavor. *Food Reviews International*, 28(4): 389–411.

Sánchez Moreno, C.; Larrauri, J.; Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food research international*. Vol. 32: 407-412.

Sarni-Manchado, P.; Fulcrand, H.; Souquet, J.M.; Cheynier, V.; Moutounet, M. (1996). Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments. *Journal of Food Science*. 61 (5): 938-941.

Sauvageot, F.; Feuillat F. (1999) The influence of oak wood (*Quercus robur* L., *Q. petraea* Liebl.) on the flavor of Burgundy Pinot noir. An examination of variation among individual trees. *Am J Enol Vitic* 50: 447–455.

Simonetti, P.; Pietta, P.; Testolin, G. (1997). Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 45: 1152-1155.

Singleton, V.L.; Noble, A.C. (1976); *Wine flavor and phenolic substances*. A.C.S. Symp Series, 26: 47-70.

Singleton, V.L. (1987). Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines and model systems: observations and practical implications. *Am J Enol Vitic*, 38: 69-77.

- Somers, T.C. (1971). The polymeric nature of wine pigments. *Phytochem*, 10: 2175-2186.
- Spillman, P. J.; Iland, P. G.; Sefton, M. A. (1998). Accumulation of volatile oak compounds in a model wine stored in American and Limousin oak barrels. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4(2): 67–73.
- Sun, B.; Neves, A.C.; Fernandes, T.A.; Fernanades, T.A.; Mateus, N.; De Freitas, V.; Leandro, C.; Spranger, M.I. (2011). Evolution of phenolic composition of red wine during vinification and storage and its contribution to wine sensory properties and antioxidant activity. *American Chemical Society*, 59: 6550-6557.
- Tat, L.; Battistutta, F.; Comuzzo, P.; Zironi, R. (2004). Rôle des différents copeaux de bois de chêne dans la libération de composés non volatils en solution modèle *Bulletin de l'O.I.V.* 77: 877-878 y 276-299.
- Teissedre, P.L.; Frankel, E.N.; Waterhouse, A.L.; Peleg, H.; German, J.B. (1996). Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolics antioxidants from grapes and wines. *J. Sci. Food Agric.* 70: 55.
- Timberlake, C.F.; Bridle, P. (1976). Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am J Enol Vitic*, 27 (3): 97-105.
- Tulyathan, V.; Boulton, R.; Singleton, V.L. (1989). Oxygen uptake by gallic acid as a model for similar reactions in wines. *J Agric Food Chem*, 37: 844-849.
- Urquiaga, I., Urzúa, U., Leighton, F. (1999). Antioxidantes Naturales. Impacto en la Salud. 8º Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites.
- Val, M. (2007). Vino tinto, taninos y buena salud. www.sabormediterraneo.com/salud/salud_vinos.htm (11/05/2014)
- Vivas,N.; Glories Y. (1995). Winemaking and wine ageing. The redox potential in winemaking. *Revue des Œnologues et des Techniques Vitivinicoles et Oenologiques* 76: 10–14.
- Yang, B.; Kotani, A.; Arai, K.; Kusu, F. (2001). Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. *Analytical Sciences* 17: 599.
- Zamora Marín, F. (2003). Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos. AMV Ediciones y Mundi-Prensa.